UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
FEB 2 '62

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

L. Jaenicke: Folsäure als Cofaktor biologischer Reaktionen . . 481

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

K. Schreiber und G. Adam: Synthese von 22,26-Iminocholestan-Derivaten 490

K. Schreiber und H. Rönsch: Synthese von Solanidin aus Demissidin 491

R. Anliker, E. Beriger und K. Schmid: Die Synthese von ^{14}C-markiertem Phosphamidon, einem neuen systemischen Insektizid 492

A. G. Terzian, R. R. Safrasbekian, R. S. Sukasian, and G. T. Tatevosian: Synthesis and some Pharmacological Properties of α-Methyltryptamine and its 5-Methoxy Derivative 493

K. Küttner, G. Huber und R. Jaques: Untersuchungen an Ionenaustauschmodellen zum Verständnis der Physiologie biogener Amine. Austauschgleichgewichte zwischen Natrium und Aminen an schwefelsäure- und karboxylgruppentragenden Ionenaustauschern 495

H. Selye and J.-M. Dieudonné: Calcification of the Parathyroids Induced by Calciphylaxis 496

G. A. Kerkut, M. L. Edwards, K. Leech, and K. A. Munday: Free Radicals in Animal Tissues 497

G. Hotz: Cysteamin-Sauerstoff-Antagonismus bei der Strahlenwirkung auf T2-Bakteriophagen 498

C. H. Clarke: The Properties of an Arginine Auxotroph of *Salmonella typhimurium* 499

E. Hansson and T. Garzo: Uptake of C^{14}-Ethionine by Mouse Foetuses 501

R. D. Buñag and E. J. Walaszek: Mechanism of the Serotonin Depressor Response Following BAS-Phenol Administration in the Dog 503

G. Bacci, G. Cognetti, and A. M. Vaccari: Endomeiosis and Sex Determination in *Daphnia pulex* 505

O. Stamm: Extraction et isolement d'une hormone placentaire à effet inhibiteur sur l'utérus 506

G. Röhrborn: *Drosophila* Tumors and the Structure of Larval Lymph Glands 507

F. Steckerl, A. Ofodile, R. R. Campbell, M. L. Turner, and G. H. Friedell: The *in vitro* Effect of Various Enzymes upon the Mouse Ascites Tumor of Ehrlich 509

R. Neher und G. Stark: Nachweis von Corticosteroiden in menschlicher Placenta und Isolierung von 16α-Hydroxytestosteron 510

U. K. Rinne and O. Kytömäki: Diurnal Rhythm in the Adrenal Ascorbic Acid Concentration of the Rat 512

F. H. Barnwell and F. A. Brown Jr.: Magnetic and Photic Responses in Snails 513

P. Winter und J. Schwartzkopff: Form und Zellzahl der akustischen Nervenzentren in der Medulla oblongata von Eulen (*Striges*) 515

E. Curio: Versuche zur Spezifität des Feinderkennens durch Trauerschnäpper 516

K. Rák, F. Krizsa, E. Sövényi und I. Cserháti: Die Wirkung der Ultraviolettbehandlung auf die Überlebensverhältnisse röntgenbestrahlter Mäuse 518

V. Kobrle and M. Chvapil: Changes of Ultrafiltrable Hydroxyproline in Blood Serum during Development of Carrageenin Granuloma and during Aging of Rats and Guinea Pigs 519

R. Kato, E. Chiesara, and G. Frontino: Induced Increase of Meprobamate Metabolism in Rats Pretreated with Phenobarbital or Phenaglycodol in Relation to Age 520

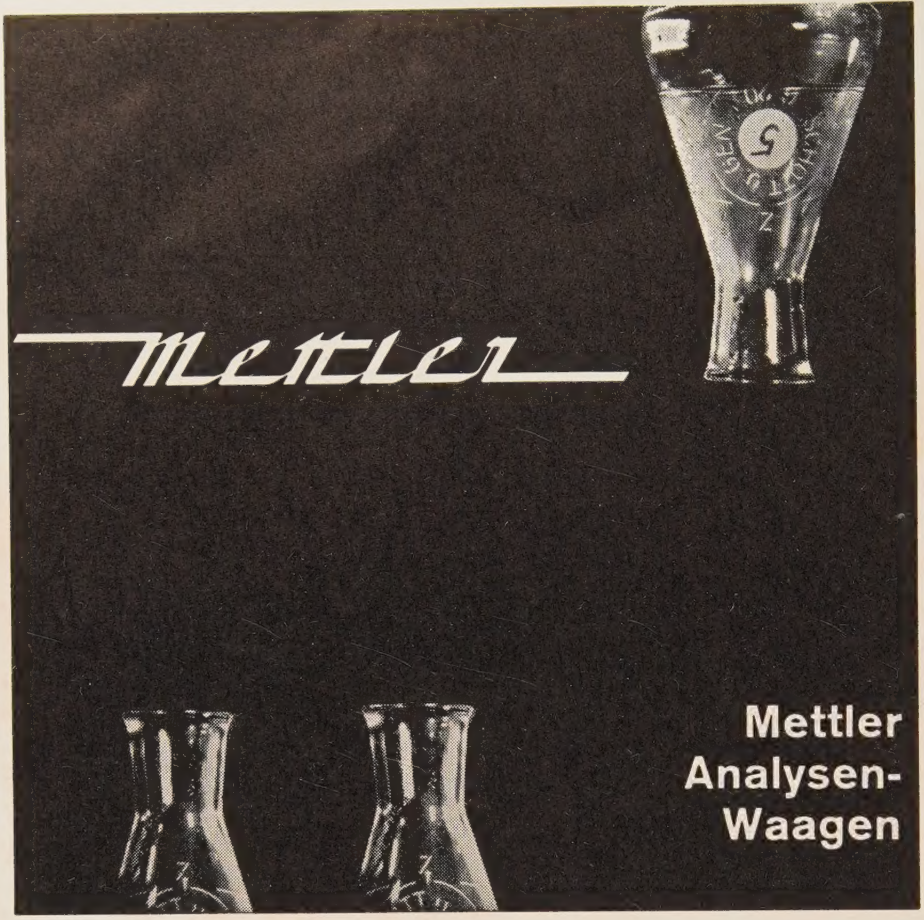
E. W. Bovard and P. Gloor: Effect of Amygdaloid Lesions on Plasma Corticosterone Response of the Albino Rat to Emotional Stress 521

C. M. Ballintijn: Fine Tipped Metal Microelectrodes with Glass Insulation (Pro Experimentis) 523

G. de Haller, Ch. F. Ehret et Rosmarie Naef: Technique d'inclusion et d'ultramicrotomie, destinée à l'étude du développement des organelles dans une cellule isolée 524

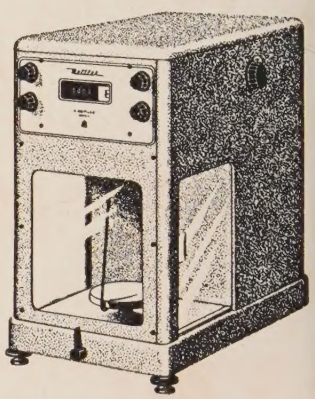
J. Mezan: Une méthode simple d'hypothermie expérimentale . 527

E. Edlinger: Quantitative Bestimmung der Zellwachstumshemmung 527



E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



A 2

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of advertisers – Experientia XVII/11

Academic Press, New York
Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J.R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Philips AG., Zürich
Regis Chemical Company, Chicago
Sandoz AG, Basel
Verlag H. R. Sauerländer & Co., Aarau
Steiner & Co., Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

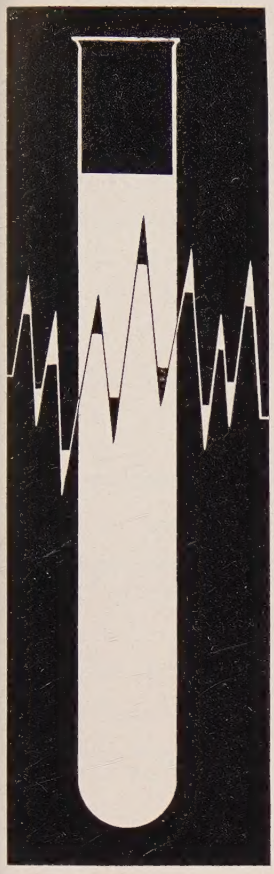
EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

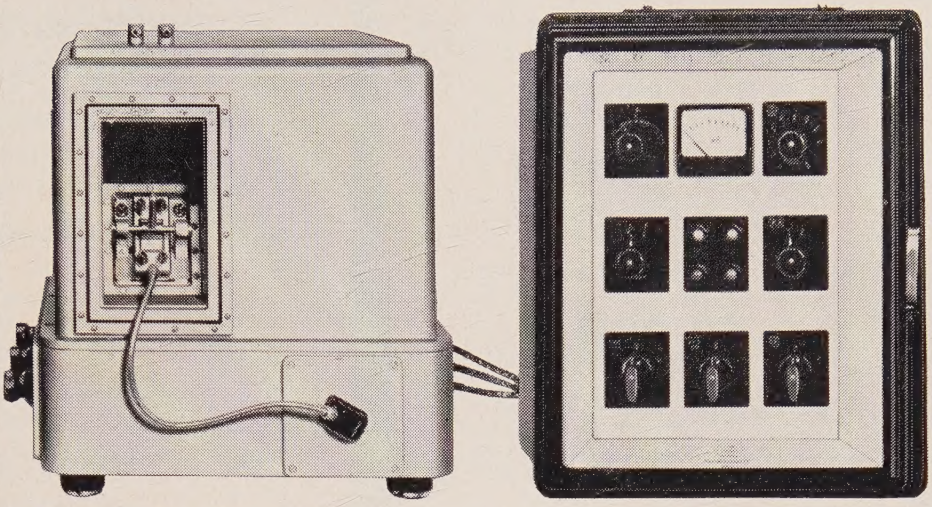
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS Refraktograph 2





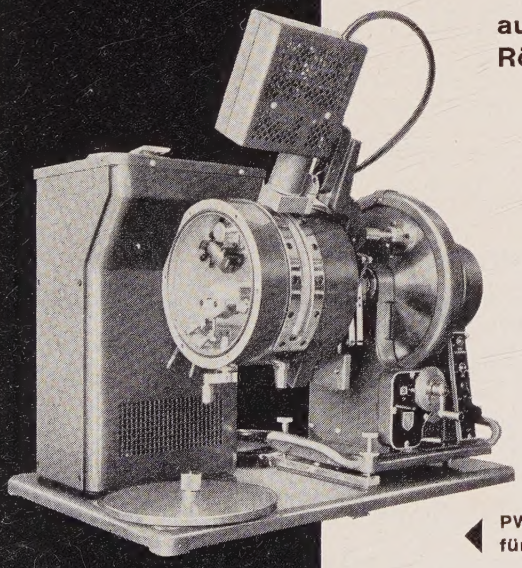
Der Zeiss Refraktograph ist die Kombination eines Abbe-Refraktometers mit einer photoelektrischen Anzeige- und Steuereinrichtung.
Er dient der kontinuierlichen selbsttätigen Messung, Fernübertragung von Messwerten und der automatischen Regelung des Fabrikationsprozesses.

GANZ *Optar* AG

Zürich, Bahnhofstr. 40
Tel. 051/25 16 75

Spektralanalyse

auch der leichten Elemente (Na) mit Röntgen-Vakuumspektrograph und Diskriminator



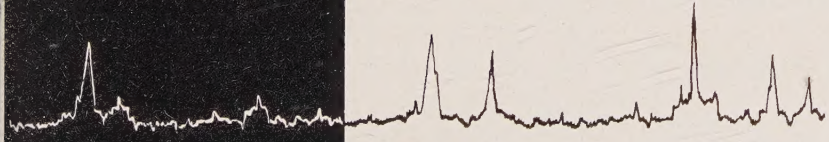
Die modernste, erprobte Philips-Apparatur arbeitet

- **einfacher**
- **rascher**
- **exakter**
- **empfindlicher**
- **sicherer**
- **zerstörungsfrei**

Neues aus unserem Lieferprogramm:

- **Vakuumspektrograph mit Spezial-Röntgenröhre hoher Dosisleistung und mit höchstem Auflösungsvermögen.**
- **Einelement-Goniometer für Routineanalysen**
- **Feinfokusröhren für Diffraktion**

PW 1540, Vakuum-Spektrograph robuster Bauart für Forschungs- und Routinearbeit



PHILIPS

Alles für Diffraktion und Analyse lieferbar durch

Philips AG Zürich, Abt. Industrie, Binzstr. 38
Telephon 051/25 86 10 und 27 04 91

WE NEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

Symposium über Farbenchemie

Basel, 24. bis 29. Juni 1960
veranstaltet
vom Schweizerischen Chemiker-Verband

Publikation sämtlicher Vorträge

Sammelband der in Chimia 1/1961 erschienenen Arbeiten.

Behandelte Gebiete:
Konstitution und Lichtabsorption
Farbstoffsynthese
Farbstoff-Substrat-Beziehung

Der Band bietet eine Orientierung über die aktuellen Probleme der Physik und Chemie farbiger Verbindungen.

Redaktion:
PD Dr. Walter Jenny, Ciba AG., Basel

227 Seiten Text, reich illustriert, zum Teil vierfarbig

Preis: sFr./DM 25.– + Porto

Verlag H. R. Sauerländer & Co.
Aarau (Schweiz) und Frankfurt am Main (Deutschland)

Eine zeitgemäße Buchreihe:

Grundlagen der chemischen Technik

Verfahrenstechnik der chemischen und verwandter Industrien
Herausgegeben von Prof. Dr. Hermann Mohler, Zürich, und Prof. Dr.-Ing. Otto Fuchs, Konstanz

BAND 1: *Dr. Peter Graßmann*, Professor an der ETH Zürich

Physikalische Grundlagen der Chemie-Ingenieur-Technik

944 Seiten. Mit 403 Abbildungen. Leinen Fr. 80.–
Die unentbehrlichen Überlegungen und Ansätze für die Behandlung verfahrenstechnischer Probleme.

BAND 2: *Dr. Otto Fuchs*, Konstanz, vormals o. Professor für chemische Technologie an der TH Darmstadt

Physikalische Chemie als Einführung in die chemische Technik

496 Seiten. 98 Abbildungen. Leinen Fr. 37.–
Erläutert die vielseitigen Anwendungen der physikalischen Chemie im technischen Bereich.

BAND 3: *Dr. sc. techn. Luigi Piatti*, Gebrüder Sulzer AG, Winterthur

Werkstoffe der chemischen Technik

388 Seiten. 154 Abbildungen. Leinen Fr. 28.–
Aufbau, Eigenschaften, Verwendung, Schädigung und Zerstörung der Werkstoffe.

BAND 4: *Dr. Ing. Romano Gregorig*, Professor an der Universität Minas Gerais in Belo Horizonte (Brasilien), vormals Escher Wyß AG, Zürich

Wärmeaustauscher

Berechnung / Konstruktion / Betrieb / Wirtschaftlichkeit
500 Seiten. 223 Abbildungen. Leinen Fr. 45.–
Für Konstrukteure und Benutzer von Wärmeaustauschern werden Kühler, Vorwärmer, Kondensatoren und Verdampfer besprochen.

BAND 6: *Dr. Ing. Friedrich Kneule*, Professor an der TH München

Das Trocknen

358 Seiten. 298 Abbildungen. Leinen Fr. 45.–
Berechnung und Apparatekonstruktion für das Trocknen in der chemischen und zahlreichen andern Industrien.

Zu jedem Band steht ein ausführlicher Prospekt zur Verfügung. Erhältlich in allen Buchhandlungen.

Verlag H. R. Sauerländer & Co.
Aarau

NEW SERIAL PUBLICATIONS

Advances in
ASTRONOMY AND ASTROPHYSICS
Edited by ZDENĚK KOPAL
Volume 1, December 1961, about 325 pp., approx. $9.50

Advances in
IMMUNOLOGY
Edited by W. H. TALIAFERRO and J. H. HUMPHREY
Volume 1, November 1961, about 450 pp., $12.00

Advances in
MATHEMATICS
(issued in parts)
Edited by HERBERT BUSEMANN
Volume 1, Fasc. 1, November 1961, 102 pp., approx. $5.00

Advances in
MORPHOGENESIS
Edited by M. ABERCROMBIE and J. BRACHET
Volume 1, June 1961, 445 pp., $12.50

Advances in
NUCLEAR SCIENCE AND ENGINEERING
Edited by H. KOUTS and E. J. HENLEY
Volume 1, 1962, in preparation

Advances in
PHARMACOLOGY
Edited by S. GARATTINI and P. A. SHORE
Volume 1, January 1962, about 450 pp., approx. $11.50

NEW JOURNALS

ANGEWANDTE CHEMIE
International Edition
(in English)
Volume 1, 1962 (12 issues), $15.00

ASLE TRANSACTIONS
A publication of the American Society of Lubrication Engineers
Volume 4, 1961, $15.00

Journal of
CATALYSIS
Volume 1, 1962, $18.00

EXPERIMENTAL EYE RESEARCH
An International Journal
Volume 1, 1961-1962, $16.00

EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY
Volume 1, 1962, $18.00

GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY
An International Journal
Volume 1, 1961, $18.00
Volume 2, 1962, $18.00

ICARUS
International Journal of the Solar System
Volume 1, 1962, $18.00

Journal of
THEORETICAL BIOLOGY
An International Journal
Volume 1, 1961, $17.00
Volumes 2-3, 1962, $12.00

Detailed literature available upon request

ACADEMIC PRESS New York and London
111 FIFTH AVENUE, NEW YORK 3
17 OLD QUEEN STREET, LONDON, S.W. 1

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J.R Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 11 Pag. 481–528 15. XI. 1961

Folsäure als Cofaktor biologischer Reaktionen*

Von L. JAENICKE**

Seit man weiss, dass Vitamine als Cofaktoren enzymatischer Reaktionen fungieren, ist die Suche nach ihren molekularen Mechanismen ein Hauptproblem der Biochemie gewesen. Der Stoffwechsel der Einkohlenstoffeinheit[1] ist aufs engste verknüpft mit dem Vitamin Folsäure (Pteroylglutaminsäure[2]), das die biologische Aktivierung, Übertragung und Umwandlung der Ameisensäure, des Formaldehyds oder der Methylgruppe katalysiert.

Die Folsäure (Fig. 1, I) wirkt in der Zelle in Form der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (II) oder eines ihrer als Konjugate bezeichneten Glutamylpeptide. Sie wird durch ein spezifisches, Triphosphopyridinnucleotid als Wasserstoffüberträger erforderndes Ferment, die Folsäure-Reduktase[3], in zwei aufeinanderfolgenden Stufen reduziert. Biologisch spielt aber nur der zweite Schritt, der reversible Übergang von Dihydrofolsäure (III) in Tetrahydrofolsäure (II), eine grössere Rolle. Dihydrofolsäure ist nämlich zunächst ein Zwischenprodukt der Folsäurebiosynthese; sie entsteht weiter auch bei bestimmten enzymatischen Reaktionen durch intermediäre Oxydation eines Tetrahydrofolsäure-Derivats. Auf Folsäure selbst wird nur im Notfall zurückgegriffen. Sie stellt eine Art Reserve dar.

Inkubiert man rohe Zellextrakte mit Tetrahydrofolsäure, einer Energiequelle und einem Substrat, das im Stoffwechsel ein Einkohlenstoff-Fragment abspalten kann – sei es als Formyl(CHO)-, Hydroxymethyl-(CH_2OH)- oder Methyl(CH_3)-Gruppe – erhält man stets die gleiche Verbindung, die durch ihre in Figur 2 zusammengestellten Reaktionen[4] als N(10)-Formyltetrahydrofolsäure identifiziert wurde. Setzt man umgekehrt diese den Zellhomogenaten zu, verschwindet sie. Sie wird entformyliert. Der Formylrest wird dabei aber nicht frei, sondern bleibt in verschiedenen Metaboliten gebunden[5]. Diese Beobachtung bildet den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen über die Folsäure-katalysierten Reaktionen. Ihr heutiger Stand soll im folgenden betrachtet werden.

Aus der Formel der Tetrahydrofolsäure ist zu erkennen, dass das Molekül aus zwei Anteilen zusammengesetzt ist, dem Pteridin-Rest und der substituierten p-Aminobenzoesäure, aus welchen es auch biosynthetisch entsteht[6]. Die die beiden Hälften verbindende Methylenbrücke ist von grosser Bedeutung, stellt sie doch einen Teil des Wirkungszentrums des Cofaktors

* Nach einem Vortrag, gehalten auf der gemeinsamen Tagung der schweizerischen, deutschen und französischen Biochemiker, Zürich (Schweiz), 12. 10. 1960.

** München (Deutschland).

[1] L. JAENICKE, Angew. Chem. *73*, im Druck (1961).

[2] E. L. R. STOKSTAD in: SEBRELL-HARRIS, *The Vitamins* (Academic Press, N.Y. 1954), Bd. III, p. 87.

[3] S. FUTTERMAN, J. biol. Chem. *228*, 1031 (1957).

[4] G. R. GREENBERG und L. JAENICKE in: WOLSTENHOLME-O'CONNOR, *Chemistry and Biology of Purines* (Churchill, London 1957), p. 204.

[5] L. JAENICKE, Habilitationsschrift (Marburg 1954). – H. M. RAUEN und L. JAENICKE, Hoppe-Seyler's Z. *293*, 46 (1953).

[6] L. JAENICKE und P. C. CHAN, Angew. Chem. *72*, 752 (1960).

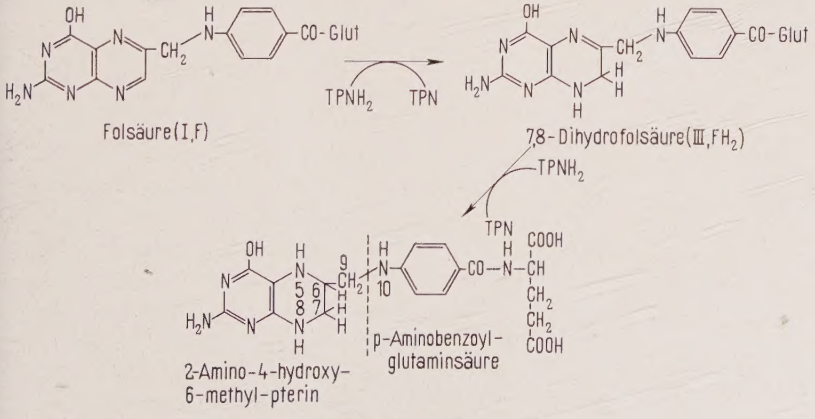


Fig. 1. Folsäure und ihre Reduktionsprodukte.

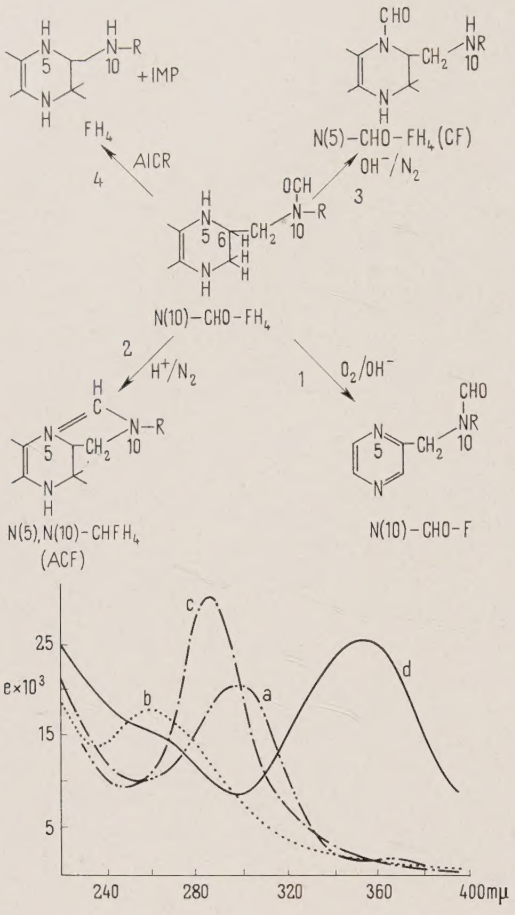


Fig. 2. Strukturbeweis der «aktivierten Ameisensäure». 1. Oxydation zu N(10)-Formyl-dihydrofolsäure und *n*(10)-Formylfolsäure. 2. Übergang in Anhydroleukovorin beim Ansäuern. 3. Übergang in mikrobiologisch voll aktiven 1,*L*-Citrovorumfaktor. 4. Transformylierung auf Amino-imidazolcarboxamid-ribotid (AICR) zu Inosinsäure (IMP). Unten: Spektren von Tetrahydrofolat-Verbindungen a) Tetrahydrofolsäure, b) N(10)-Formyltetrahydrofolsäure, c) N(5)-Formyltetrahydrofolsäure, d) N(5),N(10)-Anhydroformyltetrahydrofolsäure.

dar, wie es sich bei der Untersuchung Folsäure-katalysierter Reaktionen und auch aus Modellbetrachtungen ergeben hat[7].

Ausser der oben genannten N(10)-Formyltetrahydrofolsäure, der eigentlichen «aktivierten Ameisensäure», wurden aus biologischem Material ihr im allgemeinen physiologisch unwirksames N(5)-Isomeres, der Citrovorumfaktor[8], und N(5)-Imidoformyl-tetrahydrofolsäure[9] isoliert. Diese cyclisiert bei der Desaminierung ebenso wie die beiden Formylverbindungen unter Einwirkung von Protonen, zu einer neuen Verbindung, der N(5),N(10)-Anhydroformyltetrahydrofolsäure[10], dem Anhydroleukovorin. Durch Reduktion geht daraus die auch natürlich vorkommende stabile N(5),N(10)-Methylentetrahydrofolsäure[11] hervor, der «aktivierte Formaldehyd». Dessen Strukturbeweis liegt in der unmittelbaren Synthese, im spektralen Verhalten und in der bemerkenswerten Stabilität des Produkts, die darauf hinweisen, dass sowohl N(10) wie auch einer der Tetrahydropyrazin-Stickstoffe substituiert sind.

Beim Betrachten der Formeln in Figur 3 fällt auf, dass die Umwandlungen und Aktivierungen der gebundenen Kohlenstoffreste an einer eng umschriebenen Stelle des gesamten komplexen Moleküls stattfinden. Wir haben als Wirkungszentrum des Cofaktors die Äthylendiamingruppierung erkannt, die von den Stickstoffen N(5) und N(10) und der sie verbindenden Zweikohlenstoffkette dargestellt wird (Fig. 4). Modell-

[7] L. JAENICKE und E. BRODE, Liebigs Ann. *624*, 120 (1959).
[8] H.E. SAUBERLICH und C.A. BAUMANN, J. biol. Chem. *176*, 165 (1948).
[9] J. C. RABINOWITZ und W. E. PRICER jr., J. Amer. chem. Soc. *78*, 5702 (1956).
[10] M. MAY, T. J. BARDOS, F. L. BARGER, M. LANSFORD, J. M. RAVEL, G. L. SUTHERLAND und W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. *73*, 3067 (1951).
[11] L. JAENICKE, Fed. Proc. *15*, 281 (1956).

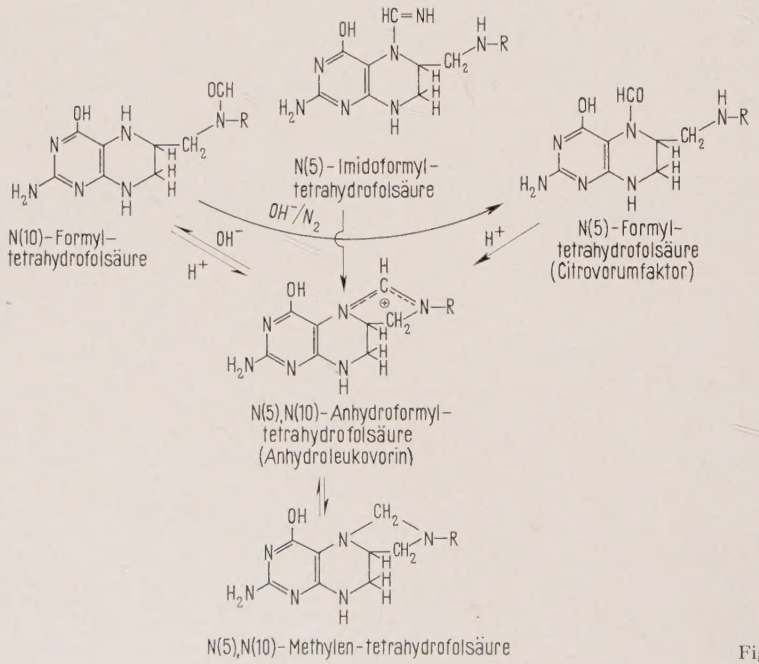


Fig. 3. Natürlich vorkommende Tetrahydrofolat-Derivate.

versuche beweisen, dass diese Anschauung berechtigt ist[7]. Es ist sogar möglich, durch entsprechende Modelle die Folsäure-abhängigen Reaktionen nicht nur chemisch nachzuahmen, sondern darüberhinaus auch am Enzym den natürlichen durch den künstlichen Cofaktor zu ersetzen[12].

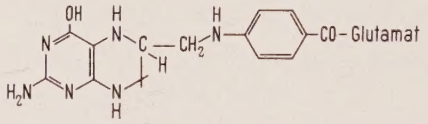
In der Tetrahydrofolsäure ist die Äthylendiamingruppe von aromatischen oder quasi-aromatischen Systemen flankiert. Wir synthetisierten daher substituierte Diaryläthylendiamine und konnten mit diesen einfachen Modellverbindungen den Mechanismus der Folsäure-abhängigen Reaktionen studieren[7]. Solche Untersuchungen sind mit Tetrahydrofolsäure nur schwer auszuführen, da ihre Instabilität die Ergebnisse unsicher macht; die Äthylendiamin-Modelle dagegen sind leicht zu handhaben und können sowohl Ameisensäure wie Formaldehyd binden.

Dem Chemiker ist es geläufig, dass diese beiden Moleküle ganz spezifische Reaktionen zeigen, durch die sie sich von ihren höheren Homologen unterscheiden. Diese besondere Reaktionsfähigkeit ist nur zum Teil durch die Dimensionen der beiden Einkohlenstoffkörper bedingt. Einen wesentlichen Beitrag liefern ihre Struktur und die eigenartigen Bindungseigenschaften. Sie bewirken die leichte Addition an Partner mit freiem Elektronenpaar, da die Carbonylbindung durch die benachbarten H-Atome stark polarisiert ist (Fig. 5). In dieser Weise lagert sich Formaldehyd auch an die Stickstoffe der Äthylendiamine zu einem Imidazolidin an. Dieses ist dem aktivierten Formaldehyd strukturanalog und kann auch im schwach alkalischen Milieu Formaldehyd übertragen. Diese Reaktionsfolge hat durchaus ihre Parallele in der bekannten Mannich-Kondensation[13]: Die Verbindung dissoziiert als Kation und kondensiert sich mit dem nucleophilen Partner unter Bildung einer C–C-Bindung. So erhalten wir nach Hydrolyse der schwächeren Bindung zum Heteroatom den freien Donator und eine neue Methylolverbindung.

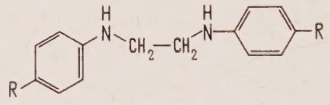
Freies Formiat lässt sich nur durch verhältnismässig drastische Mittel zu Formaldehyd reduzieren. Die Umwandlung der Imidazolidinverbindungen gelingt aber bereits unter biologischen Bedingungen. Dabei entsteht aus dem gebundenen Formaldehyd gebundenes Formiat – zunächst in Form des Imidazoliniumsalzes, das sich durch ein charakteristisches langwelliges Spektrum auszeichnet. Unter Wirkung von Hydroxylionen wird der Oniumring geöffnet: Man erhält in reversibler Reaktion die gleiche N-Formylverbindung, die man auch durch direkte Kondensation von Ameisensäure mit dem Äthylendiamin darstellen kann.

Die Formylgruppe ist in diesen Verbindungen polarisiert, sozusagen «energiereich», kann eine Hydroxamsäure geben oder sogar formylierend wirken. Als wirksame Form kann man – wie bei der Vilsmeier Reaktion[14] – die am stärksten polarisierte Grenzstruktur einer solchen Formylverbindung betrachten, das resonanzstabilisierte Isonitriliumsalz[15]. Dieses Kation lässt sich durch Einwirken von Phosphoroxychlorid auf die Formylverbindung darstellen und zeigt alle Eigenschaften eines aktiven Formyldonators. An ihm greift der negativ geladene Reaktionspartner an, es entsteht eine Orthoverbindung, die in der Richtung des grössten Resonanzenergiegewinns zerfällt, nämlich in formylierten Acceptor und freien Donator. Eine dritte Reaktion der Folat-Coenzyme, die Bildung von Methylgruppen, gelingt mit den einfachen Modellen nicht. Das ist auch nicht zu erwarten, denn, wie wir jetzt wissen, ist für diese Reaktion der Tetrahydropyrazin-Ring der Tetrahydrofolsäure notwendig.

Der fundamentale Mechanismus der Folsäure-katalysierten Reaktionen liegt damit in der Fähigkeit des Vitamins, die Einkohlenstoffkörper in eine aktivierte Form zu bringen, so dass Übertragungen und Umwandlungen des biologischen Bausteins am Cofaktor erfolgen können: An den gebundenen Einkohlenstoff-Einheiten setzen dann Reaktionen in einem physiologischen Milieu ein, die an den freien Substraten nicht möglich wären, da durch die Kondensation mit den Stickstoffatomen die Polarisierung der verschiedenen



Tetrahydrofolsäure



N,N'-Diaryl-äthylendiamin

Fig. 4. Diaryläthylendiamine als Modelle der Tetrahydrofolsäure.

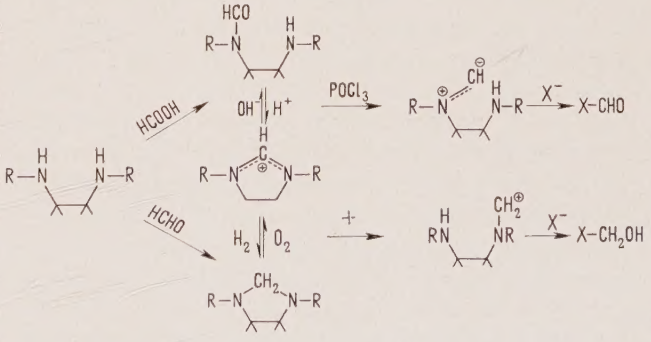


Fig. 5. Reaktionen der Tetrahydrofolatmodelle mit Formiat und Formaldehyd.

[12] E. Brode, Diplomarbeit (Marburg 1959).

[13] H. Hellmann und G. Opitz, *α-Aminoalkylierung* (Verlag Chemie, Weinheim 1960).

[14] H. H. Bosshard und H. Zollinger, Helv. chim. Acta *42*, 1659 (1959).

[15] I. Ugi und R. Meyr, Angew. Chem. *70*, 702 (1958).

Bindungen verändert wird. Der Cofaktor hat dadurch tatsächlich die Funktion eines Katalysators. Alle diese Vorgänge werden in der Zelle durch entsprechende Folatfermente, sog. Pteroproteine[16], bewirkt. Durch Kombination können sie die verschiedenen Reaktionsketten katalysieren, die anschliessend besprochen werden.

Durch die Arbeiten von GREENBERG[4,17] und BUCHANAN[18] war es bekannt, dass die Biosynthese des Purinrings durch den Ringschluss der 2- und 8-Stellung mit einer Einkohlenstoffeinheit vollendet wird (Fig. 6).

Hierbei wurde auch das erste Mal in einem zellfreien System die enge Verknüpfung dieser Reaktionen mit der Folsäure-aktivierten Ameisensäure gezeigt[19]. Den tatsächlichen Acceptor der aktivierten Einkohlenstoff-Einheit fand GREENBERG im Nucleotid des 5(4)-Aminoimidazol-4(5)-carbonsäure-amids, bei dessen Transformylierung Inosinsäure entsteht[20]. Der Donator ist eine formylierte Tetrahydrofolsäure – allerdings nicht Citrovorumfaktor – die durch ATP-getriebene enzymatische Kondensation aus Tetrahydrofolsäure mit Formiat entsteht[4,21]. Die die Aktivierung bewirkende Tetrahydrofolatformylase wurde aus verschiedenen Quellen weitgehend (vgl. [16]) angereichert. Sie katalysiert die reversible Gesamtreaktion[22].

$$FH_4 + ATP + HCOOH \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} N(10)\text{-Formyl-}FH_4 + ADP + H_3PO_4 \quad (1)$$

Die Bilanz dieser Reaktion ist in Tabelle I gezeigt[23].

Das unmittelbare Produkt der Formylasereaktion ist N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure. Die Brückenverbindung Anhydroleukovorin wird, wie aus Figur 7 hervorgeht, nicht gebildet. Man beobachtet bei spektrophotometrischer Verfolgung der Aktivierungsreaktion keine Veränderung bei 360 mμ, dem Absorptionsmaximum dieser Verbindung.

Ein interessantes Problem ist der Mechanismus dieser Reaktion, der für eine Reihe ähnlich zu formulierender von grundsätzlicher Bedeutung ist. Die Erhaltung der freien Energie ist ein Prinzip der Energieübertragung. Aus den ^{18}O-Versuchen von COHN[24] können wir verallgemeinern, dass bei einer Spaltung von ATP in ADP und Orthophosphat die Bindung zwischen dem terminalen Phosphor der ATP und dem Sauerstoff gelöst wird, so dass diese Reaktionen tatsächlich als nucleophile Substitutionen, die katalysierenden Enzyme als Transphosphorylasen zu betrachten sind. Obgleich solche Messungen für die Formylase, die ebenfalls eine spezifische Phosphatase ist, noch nicht vorliegen, sind wir auf indirektem Weg, durch Verfolgen von Austauschreaktionen[25] und durch Hemmversuche zum gleichen Schluss gekommen[26]. Eine ADP-Aktivierung und Formylphosphat als Zwischenprodukt konnten ausgeschlossen werden. Freies anorganisches Phosphat ist nicht an der Rückreaktion beteiligt, wie das auch bei anderen Reaktionen mit gleicher ATP-Bilanz der Fall ist: Wir können daher die

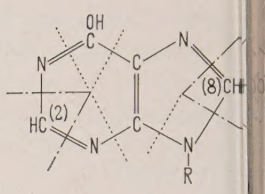


Fig. 6. Schema der Purinbiogenese.

Tab. I. Bilanz der Tetrahydrofolat-Formylase aus Taubenleber

FH_4	HCOOH	ATP	$\xrightarrow{Mg^{2+}}$ N(10)-Formyl-FH_4	ADP	P
Start (μMol)					
1,26	1,55	1,92	0,0	0,03	0,0
Ende (μMol)					
0,84	1,18	1,52	0,38	0,40	0,4
Differenz (μMol)					
−0,42	−0,37	−0,40	+0,38	+0,37	+0,4

Ansatz (μMol): Trispuffer pH 7,8 40, FH_4 1,3, HCOOK (5200 cpm μ*M*) 1,5 $MgCl_2$ 2,0, Thioglykolat 6. 60 μg Formylase (3,7 AE). Vol. 0,5 ml. 15 min 37°. Bestimmungsmethoden: FH_4 und N(10)-Formyl-FH_4 spektrophotometrisch; ATP, ADP enzymatisch im gekoppelten Test; Phosphat nach FISKE-SUBBAROW; Formiat und N(10)-Formyl-FH_4 durch Radioaktivität.

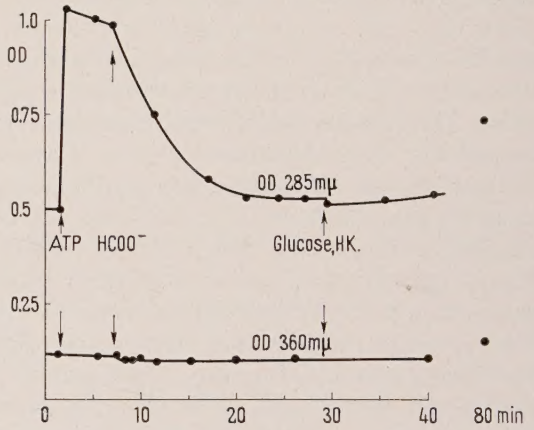


Fig. 7. Optischer Test der Tetrahydrofolat-Formylase. Die Küvette enthält in 0,6 ml: 0,062 μMol FH_4, 5 μMol $MgCl_2$, 6 μMol Thioglykolat, 23 μg Enzym. Es wurden zugesetzt: 1,0 μMol Formiat, 0,5 μ*M* ATP, 50 μ*M* Glucose + 30 μg Hexokinase. Raumtemperatur.

[16] F. M. HUENNEKENS und M. J. OSBORN, Adv. Enzymol. *21*, 369 (1959). – F. M. HUENNEKENS, H. R. WHITELEY und M. J. OSBORN, J. cell. comp. Physiol. *54*, Suppl. 1, 189 (1959).

[17] D. A. GOLDTHWAIT, R. A. PEABODY und G. R. GREENBERG in: MCELROY-GLASS, *Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 765.

[18] J. M. BUCHANAN und S. C. HARTMAN, Adv. Enzymol. *21*, 199 (1959).

[19] J. M. BUCHANAN, J. biol. Chem. *202*, 241 (1953).

[20] G. R. GREENBERG, Fed. Proc. *12*, 651 (1953).

[21] L. JAENICKE, Biochim. biophys. Acta *17*, 588 (1955).

[22] G. R. GREENBERG, L. JAENICKE und M. SILVERMAN, Biochim. biophys. Acta *17*, 589 (1955).

[23] L. JAENICKE und E. BRODE, Biochem. Z., im Druck.

[24] M. COHN, Biochim. biophys. Acta *37*, 344 (1960).

[25] L. JAENICKE, 4. Intern. Kongress für Biochemie, Wien 1958 (Pergamon Press, London 1958), Vortragsreferate S. 47.

[26] E. BRODE, Dissertation Marburg (1960). – L. JAENICKE und E. BRODE, in Vorbereitung.

Reaktion als aus Enzym-gebundenen Teilschritten (2) und (3) bestehend formulieren:

$$ATP + FH_4 \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \{FH_4 \sim PO_4^{2-}\} + ADP \qquad (2)$$

$$\{FH_4 \sim PO_4^{2-}\} + HCOOH \rightleftharpoons N(10)\text{-Formyl-}FH_4 + H_3PO_4 \qquad (3)$$

in denen das erste Gleichgewicht weit nach links, das zweite weit nach rechts liegt[4]. Für eine signifikante Reaktion wären dann alle Substrate nötig, denn wie bei der Glutathionsynthese[27] ist die Reversibilität der Gesamtreaktion von genügenden Mengen des Zwischenprodukts abhängig, das das Enzym absättigen und die Reaktion umkehren kann.

Durch Spaltung von N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure in Gegenwart von ADP und Phosphat entsteht ATP. Die Formamidbindung der «aktivierten Ameisensäure» stellt also einen neuartigen Typ einer «energiereichen Bindung» dar, die bei dem überaus interessanten, von RABINOWITZ[9,28] auf elegante Weise aufgeklärten anaeroben Abbau des Xanthins durch Bakterien eine Schlüsselposition einnimmt. Hierbei wird aus dem heterocyclischen System durch eine Reihe von vorbereitenden Schritten Imidoformylglycin gebildet (Fig. 8).

Seine HN=CH-Gruppe wird auf Tetrahydrofolsäure übertragen: Es entsteht N(5)-Imidoformyl-tetrahydrofolsäure, die unter enzymatischer Abspaltung von Ammoniak in Anhydroleukovorin übergeht. Dies wird durch eine spezifische Cyclohydrolase in N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure umgewandelt. Die Spaltung dieser Verbindung, zusammen mit der Bildung von ATP, in Umkehr der von uns studierten Formylasereaktion, ist die Basis des Energiestoffwechsels von *Clostridium cylindrosporum* und *Cl. acidi-urici*.

Das aus den verschiedenen Beobachtungen zusammengesetzte Schema des Mechanismus der Folatformylase[26] (Fig. 9) besteht primär in der Bildung eines Enzymphosphats, das seine Energie auf Tetrahydrofolsäure überträgt, so dass ein enzymgebundenes Tetrahydrofolylphosphat entsteht. Dies wird formolytisch gespalten, indem zunächst N(5) aktiviert und formyliert wird und ein N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-Zwischenprodukt auftritt. Zum Verständnis dieses Vorgangs helfen wiederum Versuche mit Modellsubstanzen. Die günstige sterische Konfiguration macht die Bildung eines intermediären cyclo-Phosphats verständlich, und die Formylierung der Phosphamidverbindung lässt sich der Hydrolyse des Anhydroleukovorins an die Seite stellen. So wie in diesem Fall ein Proton addiert wird, greift bei der Formylierung ein Formylkation an. In der Endphase des Mehrzentrenprozesses haben wir dann den Zerfall des Komplexes in Enzym, Phosphat und formylierten Cofaktor. Die gleiche Zwischenverbindung müssen wir auch bei der Isomerisierung des Citrovorumfaktors[29] und bei den Übertragungsreaktionen von Formiat auf Acceptoren erwarten[18]. In diesem Fall ist tatsächlich eine Phosphatabhängigkeit zu beobachten[30].

Die einzelnen Schritte des molekularen Mechanismus folgen einander in der Art einer Mehrzentrenreaktion: Die Polarisierung einer Bindung bewirkt sogleich die Polarisierung der nächsten, bis die Endprodukte frei werden. Das schliesslich isolierte Produkt, N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure, liegt auf einem niedrigeren Energieniveau als die Zwischenstufen, wie es in Figur 10 dargestellt ist, die die relativen Energien der verschiedenen bei den Einkohlenstoff-Reaktionen auftretenden Verbindungen darstellt.

Figur 10 deutet gleichzeitig eine weitere wichtige Reaktion der Einkohlenstoffkörper an: Die Bildung der Methylentetrahydrofolsäure aus freiem oder gebundenem Formaldehyd und ihre Oxydation.

Unter den Vorläufern der Formylgruppe der aktiven Ameisensäure ist neben Formiat, Purinen oder Histidin das Serin die wirksamste Verbindung. Sein β-Kohlenstoff steht mit Formaldehyd im Gleichgewicht und man

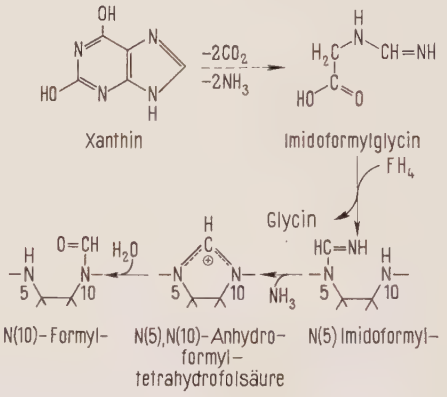


Fig. 8. Anaerober Abbau des Xanthins (gekürzt).

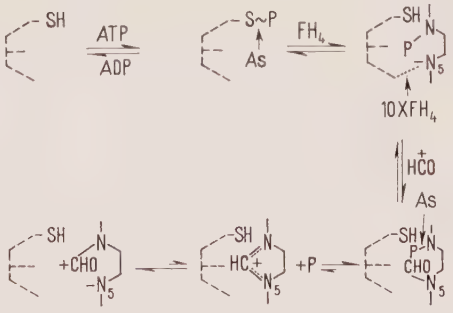


Fig. 9. Vorgeschlagener Mechanismus der Formiataktivierung durch Tetrahydrofolat-Formylase. As und 10 XFH_4 hemmen die Reaktion an den angedeuteten Stellen.

[27] J. E. SNOKE, S. YANARI und K. BLOCH, J. biol. Chem. *201*, 573 (1953). – S. MANDELES und K. BLOCH, J. biol. Chem. *214*, 639 (1955).

[28] L. A. HEPPEL und J. C. RABINOWITZ, Ann. Rev. Biochem. *27*, 613 (1958).

[29] J. M. PETERS und D. M. GREENBERG, J. biol. Chem. *226*, 329 (1957).

[30] Eigene Beobachtungen.

kann sogar sagen, dass Serin das Stoffwechselreservoir an Einkohlenstoff-Bausteinen darstellt, wie es aus den Untersuchungen von SHEMIN[31] und SAKAMI[32] deutlich wird.

Bei der Umwandlung von Glycin und Serin ineinander oder beim Übergang in die Ureid-Positionen der Purine[33] tritt die Kohlenstoffeinheit nicht frei auf[34], sondern an Tetrahydrofolsäure gebunden. Es war eigentlich hier das erste Mal, dass dieser Cofaktor enzymatisch eingesetzt wurde.

Leberextrakte können nämlich unter diesen Bedingungen den β-Kohlenstoff des Serins in N(10)-Formyltetrahydrofolsäure umwandeln, wozu das System Triphosphopyridinnucleotid benötigt[4,11]. Die Gesamtgleichung (4) ergibt sich aus der in Figur 11 gezeigten Bilanz

$$\text{Serin} + FH_4 + TPN^+ \rightleftharpoons \text{Glycin} + \text{N(10)-Formyl-}FH_4 + TPNH + H^+. \quad (4)$$

Es konnte nachgewiesen werden, dass N(10)-Formyltetrahydrofolsäure die Formylgruppe unter Reduktion auf Glycin übertragen kann, dass dabei Serin entsteht, die Gesamtreduktion also reversibel ist[5,35]. Nach Auftrennung des Serin-abbauenden Systems in die beiden Enzyme, Serinhydroxymethylase und Methylentetrahydrofolat-dehydrogenase, liess sich der Mechanismus des Vorgangs klären[11]. Das erste, Tetrahydrofolsäure benötigende Enzymsystem hat die folgende Reaktion (5):

$$\text{Serin} + FH_4 \xrightleftharpoons{(Mn^{2+})} \text{N(5), N(10)-Methylen-}FH_4 + \text{Glycin}. \quad (5)$$

Das Reaktionsprodukt, N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure, dessen Konstitution eingangs erörtert wurde, häuft sich an und kann in der zweiten Reaktion eingesetzt werden. Sie ist TPN^+-abhängig und folgt der Gleichung (6):

$$\text{N(5), N(10)-Methylen-}FH_4 + TPN^+ \rightleftharpoons \text{N(10)-Formyl-}FH_4 + TPNH + H^+. \quad (6)$$

Die Tabelle II zeigt, dass die Reaktionen der angegebenen Formulierung folgen: Mit Serinhydroxymethylase entstehen «aktiver Formaldehyd» und Glycin in äquimolaren Mengen. Die Dehydrogenase reagiert nicht mit Serin. Koppeln wir jetzt beide Enzyme, finden wir N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure und Glycin, nicht jedoch «aktiven Formaldehyd». Setzt man diesen aber ein, kann er durch Triphosphopyridinnucleotid oxydiert werden. Das lässt sich bequem im optischen Test (Fig. 12) verfolgen, der gleichzeitig beweist, dass die Reaktion für dieses Pyridinnucleotid spezifisch ist. Weitere Fraktionierung und Versuche mit Modellverbindungen der Tetrahydrofolsäure ergaben, dass die Serinhydroxymethylase als Cofaktor Pyridoxalphosphat benötigt[11,36]. Tetrahydrofolsäure ist also eines der beiden Substrate der Enzyme. Wir

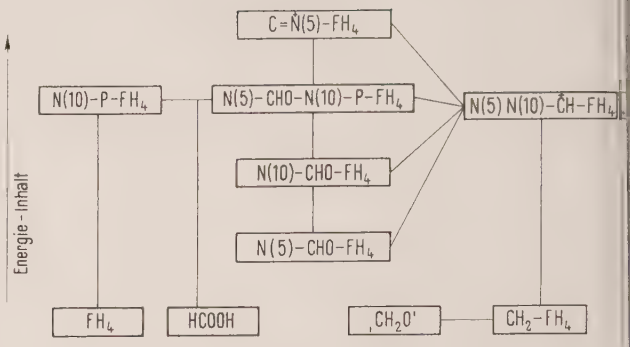


Fig. 10. Relative Energie-Inhalte verschiedener Einkohlenstoffkörper.

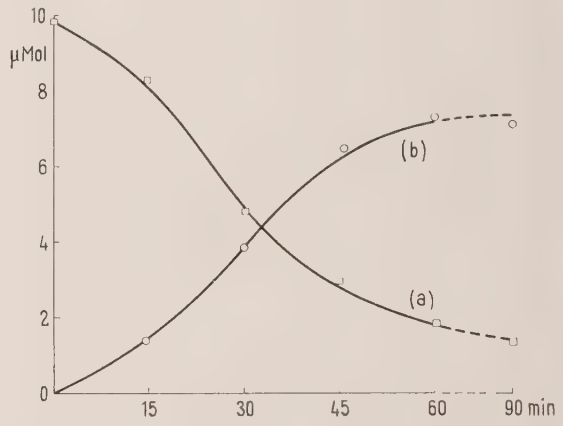


Fig. 11. Bilanz der Serinspaltung. Inkubiert wurden: 10 µMol β-^{14}C-Serin, 2 µMol FH_4, 300 µg DPN, 5 µMol α-Ketoglutarat, 5 µMol Pyruvat, 0,15 mg Schweineleberextrakt. Die Aminosäuren wurden papierchromatographisch als Dinitrophenylderivate isoliert (Rf in Toluol (50)-Pyridin (10)-Äthylenchlorhydrin (30)-0,8 *M* NH_4OH (30) org. Phase: Glycin 0,37; Serin 0,30; die Folatverbindungen in 5% Na_2HPO_4 + 10^{-3} *M* Komplexon + 10^{-2} *M* Thioglykolat (Rf: N(10) Formyl-FH_2 0,46; Citrovorumfaktor 0,72).
□ Serin (a) ○ Formyl-folatverbindungen (gesamt) (b).

Tab. II. Bilanz der Serinspaltung

	Serin + FH_4 $\overset{(A)}{\rightleftharpoons}$ Methylen-FH_4 + Glycin			
	Methylen-FH_4 + TPN^+ $\overset{(B)}{\rightleftharpoons}$ Formyl-FH_4 + TPNH + H^+			
Serinhydroxymethylase (A)	+	+	–	–
Dehydrogenase (B)	+	–	+	+
Serin (2 µMol)	+	+	+	–
Methylen-FH_4 (0,1 µMol)	–	–	–	+
Glykokoll (µMol)	0,24	0,19	0,03	–
Methylen-FH_4 (µMol)	0	0,27	–	–
Formyl-FH_4 (µMol)	0,20	0	0,02	0,085

Ansatz (µMol): TPN^+ 0,1, FH_4 0,6, $MnCl_2$ 1,8, Pyruvat 10, MDH 25E in 1 ml 0,05 *M* K-phosphat pH 7,8

[31] D. SHEMIN, J. biol. Chem. *162*, 297 (1946).
[32] W. SAKAMI in: MCELROY-GLASS, *Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 658.
[33] D. B. SPRINSON in: MCELROY-GLASS, *Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 608.
[34] C. MITOMA und D. M. GREENBERG, J. biol. Chem. *196*, 599 (1952).
[35] R. L. KISLIUK und W. SAKAMI, Fed. Proc. *13*, 242 (1954). – R. L. BLAKLEY, Biochem. J. *58*, 448 (1954).
[36] S. DEODHAR und W. SAKAMI, Fed. Proc. *12*, 195 (1953).

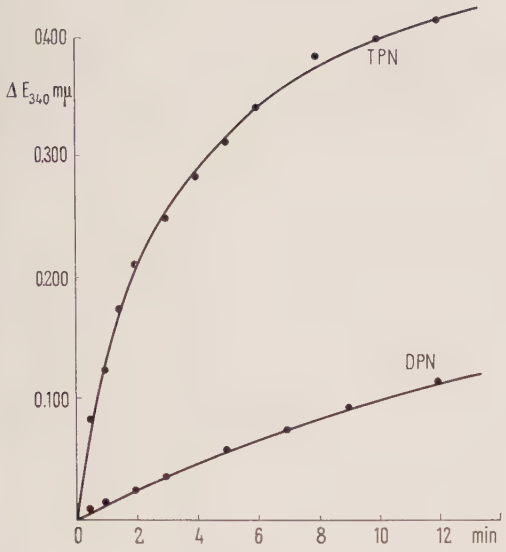


Fig. 12. Optischer Test der Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase aus Taubenleber. Die Küvette enthält: 0,6 μMol N(5), N(10)-Methylentetrahydrofolsäure (papierchromatographisch einheitlich, Rf (Na_2HPO_4) 0,66–0,69); 10 μMol KCl, 5 μMol $MgCl_2$, 22 μg Enzymprotein in 0,95 ml 0,02 *M* K-phosphat. 25°. Bei 0 min Zugabe von 0,5 μMol TPN^+ bzw. DPN^+.

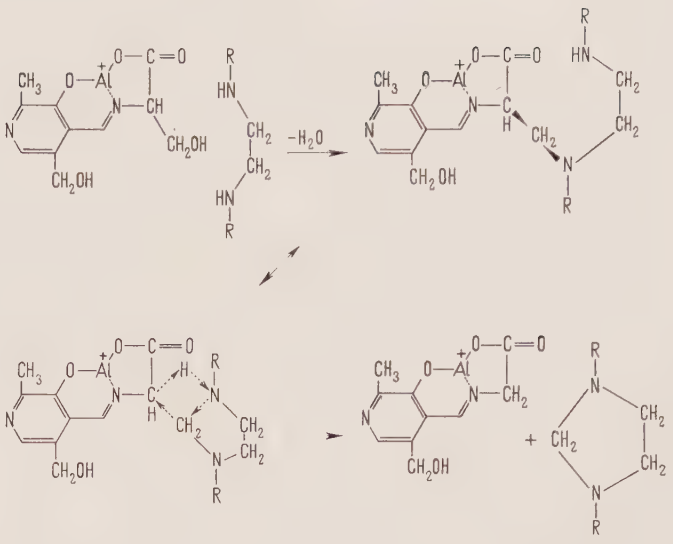


Fig. 13. Reaktionsmechanismus der Serinhydroxymethylase.

konnten im Verlauf unserer Modelluntersuchungen zum Verständnis der Mechanismen von Folat-katalysierten Reaktionen nachweisen, dass tatsächlich eine Additionsverbindung des Pyridoxal-aktivierten Serins[37] mit der Wirkgruppe der Tetrahydrofolsäure entsteht[38]. Weder Pyridoxal noch das aromatische Äthylendiamin können für sich Serin spalten. Mit beiden zusammen aber werden grosse und stöchiometrische Mengen an gebundenem Formaldehyd und Glycin gemessen. Die in Figur 13 gezeigte Reaktionsfolge gibt daher ein Bild des Mechanismus der Serinhydroxymethylase und damit eines der wichtigsten Schritte zur Bereitstellung biologisch aktiver Einkohlenstoff-Fragmente. Auch hier lässt sich am Enzym ein echtes Zwischenprodukt nicht isolieren, weil Knüpfen und Lösen der im Reaktionskomplex zusammengefassten Bindungen voneinander abhängen.

Während bei dieser Reaktion gezeigt werden konnte[30], dass die Reduktion des Formylrestes unmittelbar durch reduziertes Pyridinnucleotid bewirkt wird, nicht durch die labilen Wasserstoffe des Cofaktors, kennen wir eine andere Gruppe von Reaktionen, bei denen Tetrahydrofolsäure direkt als Reduktionsmittel dient. Obschon diese Möglichkeit seit längerem diskutiert wurde, ist sie doch erst in letzter Zeit für die Bildung der Methylgruppe des Thymins und Methionins nachgewiesen worden. Seit den Arbeiten von Sprinson[33] ist es bekannt, dass wiederum die β-Gruppe des Serins, die, wie wir gesehen haben, im Stoffwechsel so leicht in aktiven Formaldehyd übergeht, auch der beste Vorläufer der Methylgruppen von Thymin und Methionin ist[39]. Wie dieser potentielle kann auch freier Formaldehyd mit Hilfe von Tetrahydrofolsäure als Methylentetrahydrofolsäure an solchen Reaktionen teilnehmen. Acceptor ist bei der Thyminsynthese ein Uracilderivat[40], bei der Methionin-Synthese[41, 42] ein Derivat des Homocysteins[41], und zwar, entsprechend Gleichung (7), S-Adenosyl-homocystein[43].

$$\text{S-Adenosyl-homocystein} + \text{N(5),N(10)-Methylen-FH}_4 \longrightarrow \text{S-Adenosylmethionin} + \text{FH}_2 . \qquad (7)$$

Die primären Produkte sind S-Adenosylmethionin und Dihydrofolsäure, die durch spezifische Reaktionen, nämlich Kreatinmethylpherase bzw. Dihydrofolatreduktase, nachgewiesen werden konnten. Sie entstehen in einander ungefähr entsprechenden Mengen (Tab. III).

Tab. III. Stöchiometrie der Methionin-Synthese

Versuch		Methionin (mμMol)	Dihydrofolat (mμMol)
I.	30 min	62	80
II.	60 min	110	143

Ansatz (μMol): Adenosylhomocystein 2,0, $^{14}CH_2O$ (8600 cpm/μ*M*) 1,5, FH_4 0,6, K-phosphat pH 7,2 10. Vol. 0,3 ml. 37°. Nach Versuchsende wurden aliquote Teile chromatographiert bzw. mit TPNH und Folsäurereduktase und mit Kreatin-Methylpherase getestet.

[37] A. E. Braunstein in: Boyer-Lardy-Myrbäck, *The Enzymes* (Academic Press, N.Y. 1960), vol. II, p. 113.
[38] E. Brode und L. Jaenicke, Biochem. Z. *332*, 259 (1960).
[39] S. Kit, Cancer Res. *17*, 56 (1957).
[40] M. Friedkin und A. Kornberg in: McElroy-Glass, *The Chemical Basis of Heredity* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1957), p. 609.
[41] P. Berg, J. biol. Chem. *205*, 145 (1953).
[42] A. Stevens und W. Sakami, J. biol. Chem. *234*, 2063 (1959).
[43] W. Wilmanns, B. Rücker und L. Jaenicke, Hoppe-Seyler's Z. *322*, 283 (1960).

Inkubiert man «aktiven Formaldehyd» mit einer Proteinfraktion aus Schweineleber, wird er in eine neue Verbindung (Fig. 14) umgewandelt, die mit Hilfe eines weiteren Enzyms die Einkohlenstoffgruppe direkt auf Adenosylhomocystein übertragen kann und die wir daher als ein N-Methylderivat der Dihydrofolsäure formulieren.

Welches sind nun die Beweise für eine unmittelbare Beteiligung der Tetrahydrofolsäure an der Methylgruppenbildung aus Formaldehyd? Zunächst wurde gefunden, dass die Reaktion kein Reduktionsmittel erfordert, wenn Substratmengen an Tetrahydrofolsäure zugegen sind. Die Menge synthetisiertes Methionin ist etwa der Menge Tetrahydrofolsäure proportional. Werden dagegen nur katalytische Mengen des Cofaktors zugesetzt, ist ein Reduktionsmittel, nämlich Triphosphopyridinnucleotid, ein oxydierbares Substrat und eine Dehydrogenase als regenerierendes System erforderlich. Die Menge verbrauchtes Triphosphopyridin-nucleotid-H_2 ist der Menge des Methionins äquivalent. Das heisst aber, dass die Wasserstoffe der Tetrahydrofolsäure offenbar unmittelbar zur Reduktion der Hydroxymethylgruppe genutzt werden. Wenn das der Fall ist, sollte sich Tritiummarkierung aus Tetratritiofolsäure in der Methylgruppe wiederfinden. Das wird nach den Ergebnissen der Tabelle IV tatsächlich beobachtet. Tritium-markierte Tetrahydrofolsäure erhält man durch Reduktion von Folsäure mit Natriumbortritid. Setzt man diese in der enzymatischen Reaktion als Substrat, zusammen mit Adenosyl-homocystein ein, isoliert das entstandene Methionin und spaltet die Methylgruppe ab, findet man das Tritium ohne wesentliche Verdünnung lediglich in der Methylgruppe, während der Rest des Moleküls unmarkiert bleibt.

Figur 16 formuliert unsere Vorstellung vom Mechanismus dieser neuartigen Reduktionsreaktion, bei der die Einkohlenstoffeinheit durch den Cofaktor nicht nur aktiviert und übertragen, sondern darüber hinaus intramolekular umgewandelt wird. In N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure ist der Wasserstoff am Kohlenstoffatom (6) gelockert, wie wir aus dem Zerfall des Moleküls in Dihydro-xanthopterin, Formaldehyd und *p*-Aminobenzoesäure wissen[1,30]. Das hiervon abgespaltene Hydrid-Ion lagert sich an das Methylen-Kation an. Es entsteht unter Ausbildung der Doppelbindung die quaternäre Verbindung, die in üblicher Weise als Transmethylierungsmittel dient und die Methylgruppe auf einen nucleophilen Partner überträgt. Das Endprodukt ist der methylierte Acceptor, also Thymin oder Methionin und Dihydrofolsäure.

Obwohl man bei dieser Umlagerungs-Reaktion einen weiteren Cofaktor wohl erwarten könnte und auch Untersuchungen von WOODS[44] und von BUCHANAN[45] eine Beteiligung von Vitamin B_{12} vermuten lassen, konnten wir bei der Methylgruppenbildung mit Leberenzymen bisher keinen Einfluss von Cobalaminderi-

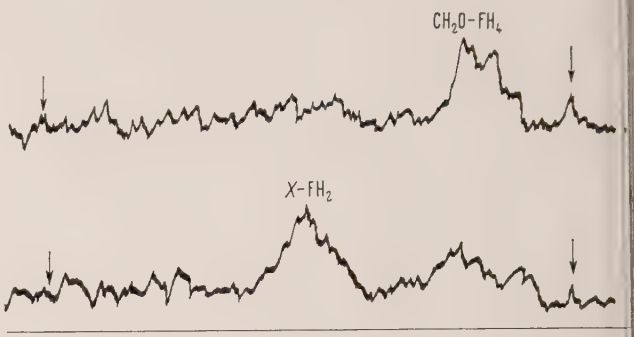


Fig. 14. Enzymatische Umwandlung von Methylen-tetrahydrofolsäure in «Methyldihydrofolat». Chromatographie in 5% Na_2HPO_4/Amylalkohol. Streifenzählung mit FH 452.

Tab. IV. Einbau von Tritium in Methionin

Tritio-FH_4 (ges. Impulse)	Methionin Spez. Akt.	Tritium in Methyl	Tritium in Homocystein
64 000	5 600	+	0
80 000	6 300	+	0

Tritio-FH_4 (durch Reduktion von FH_2 mit $NaBT_4$), 0,16 µMol; Adenosylhomocystein 2,0 µMol; CH_2O 1,5 µMol in 0,3 ml K-phosphat pH 7,4. Nach Inkubation wurden Folatverbindungen an Kohle adsorbiert und Methionin isoliert. Zählung im Gasdurchflusszähler.

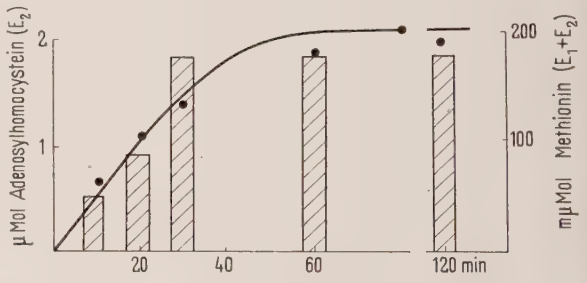


Fig. 15. S-Adenosylhomocystein als Acceptor der Methylgruppe. Präinkubation von ATP und Homocystein mit Adenosylhomocysteinsynthetase. Entfernung von ATP mit Apyrase, Hauptinkubation mit Methylentetrahydrofolsäure und Enzym I + II. Analyse durch Messung des *de novo* entstandenen Methionions.

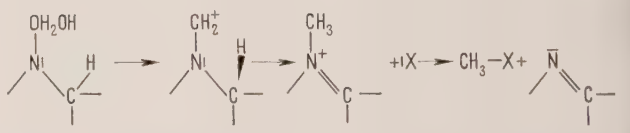


Fig. 16. Vorgeschlagener Mechanismus der Methylgruppenbildung.

[44] R. L. KISLIUK und D. D. WOODS, Biochem. J. *75*, 467 (1960).
[45] F. T. HATCH, S. TAKEYAMA, R. E. CATHOU, A. R. LARRABEE und J. M. BUCHANAN, J. Amer. chem. Soc. *81*, 6525 (1959).

vaten beobachten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die mitgeteilten B_{12}-Effekte an der Bildung des eigentlichen natürlichen Folat-Cofaktors[46] beteiligt sind, dessen Struktur noch immer unbekannt ist. Tetrahydrofolsäure selbst scheint nur ein Bruchstück zu sein, das das aktive Zentrum des Cofaktors enthält[47].

Die Funktion biologischer Katalysatoren besteht darin, den Energiebedarf biochemischer Reaktionen zu vermindern, indem sie Bindungen bilden und lösen, ohne dass die Bindungsenergie verloren geht. Um jedoch ihre Funktion als Katalysator erfüllen zu können, müssen die Cofaktoren aber auch noch in einem cyclischen Prozess stehen, in dem sie zurückgebildet werden und in die Reaktionen von neuem eintreten.

Unter diesem Gesichtspunkt sollen die geschilderten Reaktionen noch einmal in Figur 17 zusammengefasst werden.

Die biologische Umwandlung der Einkohlenstoff-Fragmente geht vom Serin als der Hauptquelle der Kohlenstoffeinheiten aus. Die Reaktionsschritte seiner Spaltung haben wir oben kennengelernt. Die dabei entstandene N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure kann die Hydroxymethylgruppe in einem Transhydroxymethylierungs-Cyclus auf Acceptoren wie Glycin oder Pyrimidine übertragen, wobei der Cofaktor wieder frei wird. Andererseits kann in der Triphosphopyridinnucleotid-abhängigen Dehydrogenasereaktion N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure gebildet werden. Diese Verbindung wird aber auch durch Spaltung der N(5)-Formamido-tetrahydrofolsäure oder durch direkte Aktivierung der Ameisensäure erhalten, wobei ATP-Energie benötigt wird, die bei der Formaldehydoxydation in Form der Oniumenergie von oxydiertem Pyridinnucleotid übertragen wird. Die «aktivierte Ameisensäure» ist nun der Träger des Formylrestes für die Bildung des Purinrings, wobei, wie BUCHANAN[18] gefunden hat, je nach der Reversibilität des Schrittes entweder die offene Form, N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure, in der nahezu irreversiblen Formylierung des 5(4)-Aminoimidazol-4(5)-carboxamid-ribotids, oder das cyclische Anhydrid, Anhydroleukovorin, in der reversiblen Formylierung des Glycinamid-ribotids, verwendet wird. Bei allen diesen Reaktionen wird ebenfalls wieder der Cofaktor in unveränderter Form frei, so dass sich ein Transformylierungs-Cyclus schliessen lässt. Für den Notfall steht aber eine von HUENNEKENS[48] entdeckte Deformylase bereit, die die N-Formylverbindung hydrolysiert und damit als Sicherheitsventil bei Verarmung an freiem Cofaktor dienen kann. Andererseits ist die Zelle in der Lage, den formylierten Cofaktor in den stabilen, aber unwirksamen Citrovorumfaktor – unter Energieverlust – umzuwandeln und auf diese Weise Formylreste zu speichern. Schliesslich geht von der Methylenverbindung noch ein weiterer Kreislauf aus. Die intramolekulare Reduktion – oder die Hydrid-Spaltung eines Kondensationsproduktes – führt zu Methylgruppen und Dihydrofolsäure. Diese wird durch die spezifische Reduktase in Tetrahydrofolsäure zurückverwandelt und vollendet auf diese Weise den Kreis. Alle diese Reaktionen des *einen* Cofaktors Tetrahydrofolsäure dienen somit der Zelle als Grundlage der verschiedenen Synthesen wichtiger Zellbausteine: von Purinen, Pyrimidinen und Aminosäuren bis zu den Kohlehydraten, an denen Einkohlenstoffkörper teilnehmen. Einige kennen wir nunmehr auch in ihrem Mechanismus und es ist wohl klar, dass unser Mangel an Kenntnis der anderen nicht auf einem Mangel an Möglichkeiten beruht[49].

Summary. Tetrahydrofolate requiring enzymes catalyze three types of biochemical reactions, *viz.* formylation, hydroxymethylation, and methyl group formation. Their chemistry and mechanism of action is discussed on the molecular level. There is evidence, from model reactions, that the ethylene diamine grouping in tetrahydrofolic acid is the active center of the cofactor. Its condensation with one-carbon compounds, together with those of the labile hydride ion of the tetrahydropteridine ring, make clear the enzymatic steps by which the one carbon fragment is activated, transferred, and reduced. In cell metabolism, these cycles are geared together by the key compound N(5), N(10)-methylene tetrahydrofolic acid. Through a TPN-linked oxidation, N(10)-formyl tetrahydrofolic acid is produced, from which energy can be derived; by intramolecular reduction, the methyl group is formed.

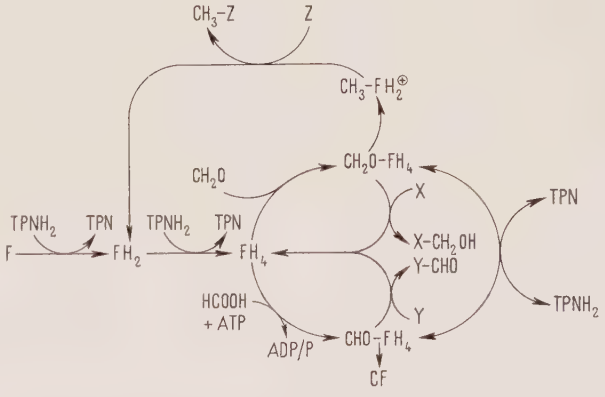


Fig. 17. Tetrahydrofolsäure-katalysierte Biosynthesecyclen.

[46] B. E. WRIGHT, 4th Intern. Congr. Biochem. Vol. XI, *Vitamin Metabolism* (Pergamon Press, London 1958), p. 266.

[47] M. SILVERMAN und B. E. WRIGHT, J. Bacteriol. *72*, 373 (1956).

[48] M. J. OSBORN, Y. HATEFI, L. D. KAY und F. M. HUENNEKENS, J. biol. Chem. *227*, 637 (1957).

[49] Ich danke Dr. G. R. GREENBERG für viele Monate glücklicher Zusammenarbeit, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Fa. C. H. Boehringer, Ingelheim, für grosszügige Unterstützung der hier zusammengefassten Arbeiten.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

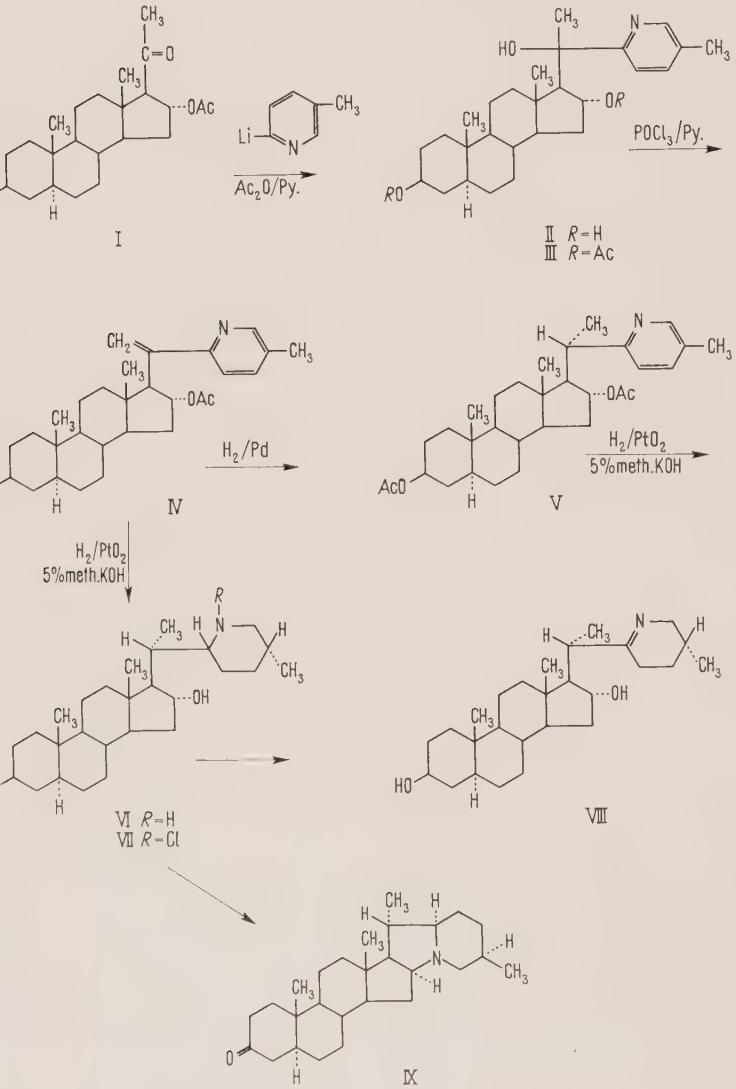
Synthese von 22,26-Imino-cholestan-Derivaten[1]

In früheren Mitteilungen[2,3] berichteten wir über die Synthese von Tetrahydro-solasodin[4] aus 3β,16β-Diacetoxy-5α-pregnan-20-on, sowie über die Umwandlung dieses sekundären Amins in das Spiroaminoketal-Alkaloid Soladulcidin[5]. Im folgenden werden analoge, von einem entsprechenden 16α-Acetoxy-pregnan-Derivat ausgehende Umsetzungen beschrieben. Diese Untersuchungen zeigen, dass sekundäre und tertiäre Basen vom Typ der *Solanum*-Alkaloide auch über solche relativ leicht gewinnbare 16α-Hydroxy-Steroide zugänglich sind.

3β,16α-Diacetoxy-5α-pregnan-20-on (I)[6] wurde aus 3β-Acetoxy-16α,17α-oxido-pregn-5-en-20-on[7] durch Reduktion mit Chrom(II)-acetat, Acetylierung und katalytische Hydrierung des entstandenen 3β,16α-Diacetoxy-pregn-5-en-20-on[8] dargestellt. Umsetzung von I mit 2-Lithium-5-methyl-pyridin[2] gab in etwa 75prozentiger Ausbeute ein einheitliches 20-[5-Methyl-pyridyl-(2)]-5α-pregnan-3β,16α,20-triol (II), Smp. 221–222°C und $[\alpha]_D^{25} - 21,6°$ (ber. für $C_{27}H_{41}NO_3$ (427,6) 75,83% C, 9,66% H, 3,28% N; gef. 75,35% C, 9,30% H, 3,39% N), dem wahrscheinlich (20R)-Konfiguration zukommt. Acetylierung von II unter üblichen Bedingungen lieferte in 88prozentiger Ausbeute das 3,16-Diacetat III, Smp. 233–235°C und $[\alpha]_D^{25} - 80,6°$ (ber. für $C_{31}H_{45}NO_5$ (511,7) 72,76% C, 8,86% H, 2,74% N; gef. 73,06% C, 8,67% H, 2,80% N). Bei der Wasserabspaltung mit Phosphoroxychlorid/Pyridin erhielten wir in 70prozentiger Ausbeute ein im Dünnschicht-Chromatogramm einheitliches Dehydratisierungsprodukt, Smp. 124–127°C und $[\alpha]_D^{26} + 34,4°$ (ber. für $C_{31}H_{43}NO_4$ (493,7) 75,42% C, 8,78% H, 2,84% N; gef. 75,65% C, 8,64% H, 2,98% N), dem wir die Konstitution des 3β,16α-Diacetoxy-20-[5-methyl-pyridyl-(2)]-5α-pregn-20-ens (IV) zuschreiben. Durch partielle Hydrierung von IV mit 10prozentiger Pd/Kohle in Äthanol gewann man in 76prozentiger Ausbeute (20S)-3β,16α-Diacetoxy-20-[5-methyl-pyridyl-(2)]-5α-pregnan (V), Smp. 230–232°C und $[\alpha]_D^{24} - 111,5°$ (ber. für $C_{31}H_{45}NO_4$ (495,7) 75,11% C, 9,15% H, 2,83% N; gef. 75,00% C, 8,89% H, 2,94% N). Sowohl bei der weiteren Hydrierung von V als auch bei der Totalhydrierung von IV mit PtO_2/Eisessig und anschliessender Verseifung (5prozentige methanolische KOH) entstand als Hauptprodukt das 22,26-Imino-5α-cholestan-3β,16α-diol VI, Smp. 285–287°C und $[\alpha]_D^{20} + 23,0°$ (ber. für $C_{27}H_{47}NO_2$ (417,7) 77,64% C, 11,34% H, 3,35% N; gef. 77,54% C, 11,04% H, 3,32% N); Triacetat: Smp. 173–176°C und $[\alpha]_D^{24} - 32,6°$ (ber. für $C_{33}H_{53}NO_5$ (543,8) 72,89% C, 9,82% H, 2,58% N; gef. 73,06% C, 9,58% H, 2,60% N).

Dieselbe Verbindung VI erhielten wir bei der katalytischen Hydrierung (PtO_2/Eisessig) von 3β,16α-Diacetoxy-20-[5-methyl-pyridyl-(2)]-pregna-5,20-dien, Smp. 152 bis 154°C und $[\alpha]_D^{22} - 28,4°$ (ber. für $C_{31}H_{41}NO_4$ (491,7) 75,73% C, 8,41% H, 2,85% N; gef. 75,71% C, 8,26% H, 2,89% N), welches auf ähnliche Weise wie IV aus 3β,16α-Diacetoxy-pregn-5-en-20-on synthetisiert wurde.

Zur Bestimmung der Konfiguration an C-22 und C-25 wurde VI über das spontan zum Carbinolamin cyclisierende



[1] *Solanum*-Alkaloide. XVI. Mitteilung. – XV. Mitteilung: K. SCHREIBER und H. RIPPERGER, Tetrahedron Letters Nr. *27*, 9 (1960).

[2] K. SCHREIBER und G. ADAM, Tetrahedron Letters Nr. *27*, 5 (1960).

[3] K. SCHREIBER und G. ADAM, Exper. *17*, 13 (1961).

[4] (22R,25R)-22,26-Imino-5α-cholestan-3β,16β-diol.

[5] 5α-Solasodan-3β-ol,(22R,25R)-22,26-Imino-16β,22-oxido-5α-cholestan-3β-ol.

[6] H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN und J. W. CORCORAN, J. org. Chem. *20*, 572 (1955). – V. SCHWARZ, V. ČERNÝ und F. ŠORM, Coll. czech. chem. Commun. *23*, 940 (1958). – R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *41*, 1667 (1958).

[7] P. L. JULIAN, E. W. MEYER und I. R. RYDEN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 367 (1950). – P. L. JULIAN, E. W. MEYER, W. J. KARPEL und I. R. WALLER, J. Amer. chem. Soc. *72*, 5145 (1950).

[8] S. BERNSTEIN, M. HELLER und S. M. STOLAR, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5674 (1954).

[9] Alle Smp. korrigiert; alle Drehwerte in Chloroform; IR-Spektren in Nujol. Herrn Dr. K. HELLER, Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für Aufnahme und Diskussion dieser Spektren. Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. A. SCHOELLER, Kronach (Obfr.), ausgeführt.

16-Diketon in ein 5α-Solanidan-3-on vom Smp. 146–149°C und $[\alpha]_D^{23} + 40{,}1$ übergeführt[10], welches mit dem bekannten, aus Tetrahydro-solasodin erhaltenen (22R, 25R)-5α-Solanidan-3-on (IX)[11] identisch war. Folglich entstehen bei der Hydrierung sowohl der 16α- als auch der 16β-Acetoxy-20-pyridyl-pregnan-Derivate[2] als Hauptprodukte 22, 26-Imino-cholestane mit gleicher sterischer Anordnung an den Asymmetriezentren C-22 und C-25. Die Konfiguration an C-16 ist also ohne Einfluss auf den sterischen Verlauf dieser katalytischen Hydrierungen. Dagegen scheint die Anwesenheit einer Acetoxy-Gruppe (oder Hydroxy-Gruppe) an diesem C-Atom für die Stereospezifität dieser Reaktion erforderlich zu sein; denn die Hydrierung des 16-unsubstituierten 3β-Acetoxy-20-[5-methyl-pyridyl-(2)]-pregna-5, 20-diens[12], Smp. 167–168°C und $[\alpha]_D^{20} + 4{,}6°$ (ber. für $C_{29}H_{39}NO_2$ (433,6) 80,32% C, 9,07% H, 3,23% N; gef. 80,28% C, 9,08% H, 3,27% N) verlief bezüglich C-22 und C-25 nicht stereospezifisch, vielmehr resultierte nach unseren papierchromatographischen Befunden ein Diastereomerengemisch verschiedener 22, 26-Imino-5α-cholestan-3β-ole.

Umsetzung von VI mit N-Chlor-succinimid[3] führte in 70prozentiger Ausbeute zum N-Chlor-Derivat VII, Smp. ca. 280°C (Zers.) und $[\alpha]_D^{24} - 49{,}9°$ (ber. für $C_{27}H_{46}ClNO_2$ (452,1) 71,73% C, 10,26% H, 7,84% Cl, 3,10% N; gef. 72,16% C, 10,41% H, 8,29% Cl, 3,21% N). Beim einstündigen Erhitzen von VII mit überschüssigem Natriummethylat/Methanol trat HCl-Abspaltung ein. Chromatographie an Al_2O_3 lieferte in 44prozentiger Ausbeute eine Verbindung vom Smp. 168–170°C und $[\alpha]_D^{26} + 114{,}8°$, die im IR-Spektrum eine starke Bande bei 1648 cm^{-1} (>C=N–) aufweist und der die Konstitution des (25R)-22, 26-Imino-5α-cholest-22(N)-en-3β, 16α-diols (VIII) zukommt (ber. für $C_{27}H_{45}NO_2$ (415,7) 78,02% C, 10,91% H, 3,37% N; gef. 78,05% C, 10,98% H, 3,35% N).

Somit findet bei VIII – offenbar aus sterischen Gründen – kein Ringschluss zum Spiroaminoketal statt[13]. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten der epimeren CN-ungesättigten 16β-Hydroxy-Verbindung[3], die als solche nicht fassbar ist, sondern nur in der tautomeren, Ring-E-geschlossenen Form, das heisst als Spiroaminoketal-Alkaloid Solafulcidin[5], auftritt. Auch unter energischeren Reaktionsbedingungen (20 h Erhitzen mit 10prozentiger methanolischer KOH) erfolgte bei VIII keine Inversion an C-16[14] und dementsprechend keine Cyclisierung. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, dass für die Synthese tertiärer Basen mit Solanidan-Gerüst (vgl. IX) auch die relativ leicht zugänglichen 16α-Acetoxy-pregnan-Derivate geeignete Ausgangsverbindungen sind. Darüber hinaus besitzen die synthetisierten Pyridyl- und Piperidyl-Steroide pharmakologisches Interesse[15].

Summary. 3β, 16α-diacetoxy-5α-pregnane-20-one and the analogue pregn-5-ene derivative have been converted into (22R, 25R)-22, 26-imino-5α-cholestane-3β, 16α-diol. The configuration at C-22 and C-25 was determined by transformation into the known (22R, 25R)-5α-solanidane-3-one. Application of the Ruschig method led to (25R)-22, 26-imino-5α-cholest-22(N)-ene-3β, 16α-diol.

K. Schreiber und G. Adam

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Forschungsstelle Mühlhausen/Thüringen (Deutschland), 1. Juni 1961.

[10] Zur Methodik vgl. Y. Sato und H. G. Latham, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3146 (1956). – R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, Angew. Chem. *64*, 397 (1952).

[11] Y. Sato, H. G. Latham und E. Mosettig, J. org. Chem. *22*, 1496 (1957). Diese Autoren geben für Verbindung VIII Smp. 146–147°C und $[\alpha]_D^{20} + 49°$ (Chlf.) an. Die von Y. Sato und N. Ikekawa (J. org. Chem. *26*, 1945 (1961)) wahrscheinlich gemachte (22R)-Konfiguration wird durch die von uns ermittelten Werte der molaren Rotationsdifferenzen bei der N-Acetylierung, N-Nitrosierung und N-Chlorierung[3] von Tetrahydro-solasodin einerseits sowie den beiden an C-22 isomeren Dihydro-tomatidinen andererseits bestätigt (K. Schreiber und G. Adam, unveröffentlicht). Alle diese Konfigurationsordnungen für C-22 sind von der für Solanidin aufgrund stereochemischer Betrachtungen postulierten Raumstruktur abgeleitet (W. E. Rosen und D. B. Rosen, Chem. and Ind. *1954*, 1581). Ihre endgültige Bestätigung steht noch aus.

[12] Dargestellt aus 3β-Acetoxy-20-[5-methyl-pyridyl-(2)]-pregn-5-en-20-ol, das bereits von F. C. Uhle (J. Amer. chem. Soc. *73*, 883 (1951); *83*, 1460 (1961)) synthetisiert wurde.

[13] Eine ähnliche, gleichfalls nicht cyclisierende Verbindung, (25R)-16β, 22-Imino-cholesta-5, 22(N)-dien-3β, 26-diol, ist von F. C. Uhle und F. Sallmann (J. Amer. chem. Soc. *82*, 1190 (1960)) erhalten worden.

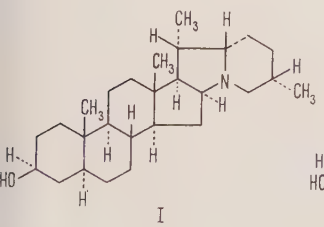
[14] Mit Ringschluss (Lactonisierung) verbundene Epimerisierungen an C-16 sind verschiedentlich beschrieben worden (vgl. A. Bowers, T. G. Halsall und G. C. Sayer, J. chem. Soc. (London) *1954*, 3070. – N. Danieli, Y. Mazur und F. Sondheimer, Chem. and Ind. *1958*, 1724). – Y. Mazur, N. Danieli und F. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5889 (1960)).

[15] Dem VEB Jenapharm, Jena, insbesondere dem Leiter der dortigen Wissenschaftlichen Laboratorien, Herrn Prof. Dr. A. Schubert, sind wir für die Unterstützung dieser Arbeiten sehr zu Dank verpflichtet.

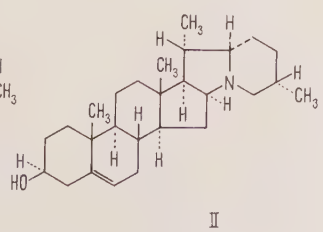
Synthese von Solanidin aus Demissidin[1]

Solanidin[2] (II) wurde auf folgendem Weg aus Demissidin (I), einem Alkaloid aus der mexikanischen Wildkartoffel *Solanum demissum* Lindl.[3], synthetisiert:

Demissidin (5α-Solanidan-3β-ol, I)[3,4] wurde durch Dehydrierung mit CrO_3/H_2SO_4/Dioxan in das bekannte 5α-Solanidan-3-on[4,5] überführt. Dieses lieferte bei der Bromierung in Eisessig in Gegenwart von etwa 2 Mol HBr ein 2, 4-Dibrom-5α-solanidan-3-on, Smp. 221–224°C und $[\alpha]_D^{22} + 5{,}2°$ (ber. für $C_{27}H_{41}Br_2NO$ (555,4) 58,38% C, 7,44% H, 28,78% Br, 2,52% N; gef. 58,14% C, 7,46% H, 28,30% Br, 2,67% N; IR-Spektrum: Keto-Bande bei



I



II

[1] *Solanum*-Alkaloide. XVII. Mitteilung. – XVI. Mitteilung: K. Schreiber und G. Adam, Exper. *17*, 490 (1961).

[2] Zum Vorkommen von Solanidin vgl. K. Schreiber, Chem. Techn. *6*, 648 (1954). – K. Schreiber, U. Hammer, E. Ithal, H. Ripperger, W. Rudolph und A. Weissenborn, Tagungsbericht Nr. *27* der Dtsch. Akad. der Landwirtschaftswiss. Berlin (im Druck).

[3] R. Kuhn und I. Löw, Chem. Ber. *80*, 406 (1947).

[4] Vgl. V. Prelog und O. Jeger, in R. H. F. Manske und H. L. Holmes, *The Alkaloids, Chemistry and Physiology* (New York 1953 und 1960), vol. III, p. 247; vol. VII, p. 343.

[5] Y. Sato und H. G. Latham, Chem. and Ind. *1955*, 444; J. Amer. chem. Soc. *78*, 3146 (1956).

1743 cm^{-1})[6]. Umsetzung nach ROSENKRANZ et al.[7] (Kochen mit NaJ in Aceton, nachfolgende Reduktion mit $CrCl_2$ und Chromatographie an Al_2O_3) führte zu einer Δ^4-3-Keto-Verbindung vom Smp. 221–223°C und $[\alpha]_D^{24}$ + 90,7°, die sich als mit authentischem Solanid-4-en-3-on[4] identisch erwies (Misch-Smp., IR-Spektrum und Dünnschicht-Chromatographie an Al_2O_3 mit Petroläther/Triäthylamin, 98:2 (v/v), Nachweis mit J_2/KJ-Lösung: Rf 0.18–0,23). Aus dieser Relaissubstanz erhielten wir nach der Methode von WESTPHAL[8] das Enolacetat 3-Acetoxy-solanida-3,5-dien, Smp. 159,5–161,5°C und $[\alpha]_D^{22}$ −76,0° (ber. für $C_{29}H_{43}NO_2$ (437,7) 79,59% C, 9,90% H, 3,20% N; gef. 79,35% C, 9,83% H, 3,39% N; IR-Banden bei 1640, 1673 und 1755 cm^{-1}). Reduktion mit $NaBH_4$[9] sowie anschliessende Trennung der entstandenen 3α- und 3β-Hydroxy-Steroide mit Digitonin gab Solanidin (Solanid-5-en-3β-ol, II)[4], das in allen Eigenschaften (Misch-Smp., spez. Drehung, IR-Spektrum und Dünnschicht-Chromatographie an Al_2O_3 mit Cyclohexan/Essigester, 1:1 (v/v): Rf 0,83) mit authentischem Solanidin übereinstimmte.

Demissidin ist bereits aus Tomatidin[5,10] und dieses Alkaloid aus 3β-Acetoxy-5α-pregn-16-en-20-on[11] synthetisiert worden, so dass nunmehr auch Solanidin sowie die hieraus dargestellten *Solanum*-Alkaloidglykoside γ-Solanin (β-D-Galaktopyranosyl-solanidin) und γ-Chaconin (β-D-Glucopyranosyl-solanidin)[4,12] totalsynthetisch zugänglich sind[13].

Summary. The steroidal alkaloid solanidine (solanid-5-ene-3β-ol, II) which occurs in the potato plant *Solanum tuberosum* L. has been synthesized from demissidine (5α-solanidane-3β-ol, I), an alkaloid from the Mexican wil potato *Solanum demissum* Lindl. The synthesis involve the following steps: 5α-solanidane-3-one, 2,4-dibrom 5α-solanidane-3-one, solanid-4-ene-3-one, 3-acetoxy-sola nida-3,5-diene, and solanidine (II).

K. SCHREIBER und H. RÖNSC

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften z Berlin, Forschungsstelle Mühlhausen/Thüringen (Deutsch land), 1. Juni 1961.

[6] Alle Smp. korrigiert; alle Drehwerte in Chloroform; IR-Spektre in Nujol. Herrn Dr. K. HELLER, Wissenschaftliche Laboratorie des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für Aufnahme und Dis kussion dieser Spektren. Die Mikroanalysen wurden von Herr Dr. A. SCHOELLER, Kronach (Obfr.), ausgeführt.

[7] G. ROSENKRANZ, O. MANCERA, J. GATIKA und C. DJERASSI J. Amer. chem. Soc. *72*, 4077 (1950).

[8] U. WESTPHAL, Ber. dtsch. chem. Ges. *70*, 2128 (1937).

[9] Zur Methode vgl. B. BELLEAU und T. F. GALLAGHER, J. Amer chem. Soc. *73*, 4458 (1951). – W. G. DAUBEN und J. F. EASTHAM J. Amer. chem. Soc. *73*, 4463 (1951). – E. SCHWENK, M. GUT un J. BELISLE, Arch. Biochem. *31*, 456 (1951).

[10] R. KUHN, I. LÖW und H. TRISCHMANN, Angew. Chem. *64*, 39 (1952).

[11] K. SCHREIBER und G. ADAM, Tetrahedron Letters Nr. *27*, 5 (1960) Exper. *17*, 13 (1961).

[12] K. SCHREIBER, Angew. Chem. *67*, 127 (1955).

[13] Dem VEB Jenapharm, Jena, insbesondere Herrn Prof. Dr. A SCHUBERT, Leiter der Wissenschaftlichen Laboratorien diese Betriebes, sind wir für die Unterstützung dieser Arbeiten sehr ver bunden.

Die Synthese von ^{14}C-markiertem Phosphamidon, einem neuen systemischen Insektizid

Die Gruppe der systemischen Insektizide hat in den vergangenen Jahren infolge ihrer speziellen Wirkungsweise immer mehr an Bedeutung gewonnen[1]. Die rasche Resorption solcher Wirkstoffe durch die Pflanze und ihr Übergang in den Saftstrom macht sie vor allem im Einsatz gegen saugende und beissende Schädlinge wertvoll. Das rasche Verschwinden des Wirkstoffes von der Pflanzenoberfläche bringt auch bei verschiedenen Präparaten eine weitgehende Schonung der nützlichen Insektenfauna mit sich. Die neuartige Wirkungsweise via Saftstrom gab anfänglich in der Beurteilung des Rückstandsproblems zu Bedenken Anlass, da man eine vermehrte Belastung der Erntegüter mit Wirkstoff befürchtete. Es hat sich aber gezeigt, dass gerade systemische Insektizide durch ihr Vordringen in den Saftstrom der Pflanze der intensiven Einwirkung der den Wirkstoff abbauenden Enzyme besonders stark und praktisch quantitativ ausgesetzt sind, und demzufolge in vielen Fällen trotz hoher Initialkonzentrationen erstaunlich rasch zu ungiftigen Spaltstücken abgebaut werden. Dies ist bei Wirkstoffen, welche sich auf der Pflanzenoberfläche ablagern oder sich in den äussern Wachsschichten speichern, meistens nicht der Fall.

Im Hinblick auf die interessanten Eigenschaften des systemischen Insektizids Phosphamidon III[2] (O,O-Dimethyl-O-(2-chlor-2-diäthylcarbamoyl-1-methylvinyl phosphat), der Erforschung seines Abbaus[2] in der Pflanz und der Bedeutung des sich ergebenden Rückstands problems[3] liess es uns wünschenswert erscheinen, zu Klärung dieser Fragen radioaktives Phosphamidon heran zuziehen.

Untersuchungen über den Metabolismus von syste mischen, phosphorhaltigen Insektiziden haben verschie dene Autoren unter anderem am Beispiel der durchwegs mit ^{32}P markierten Verbindungen O,O-Diäthyl-S-(äthyl thiomethyl)-dithiophosphat[4], O,O-Dimethyl-O-(2-carbo methoxy-1-methylvinyl)-phosphat[5] und O,O-Dimethyl S-(äthylthioäthyl)-thiolphosphat[6] beschrieben. Die sonst

[1] W. E. RIPPER, Advances in Pest Control Research *1*, 305 (1957). – R. L. METCALF, Bull. Ent. Soc. Amer. *5*, 3 (1959).

[2] R. ANLIKER, E. BERIGER, M. GEIGER und K. SCHMID, Helv. chim. Acta *44*, 1622 (1961).

[3] R. ANLIKER und M. GEIGER, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg., in Vorbereitung.

[4] R. L. METCALF, T. R. FUKOTO und R. B. MARCH, J. Econ. Ent. *50*, 338 (1957). – J. S. BOWMAN und J. E. CASIDA, J. Agr. Food Chem. *5*, 192 (1957).

[5] J. E. CASIDA, P. E. GATTERDAM, J. B. KNAAK, R. D. LANCE und R. P. NIEDERMEIER, J. Agr. Food Chem. *6*, 658 (1958).

[6] R. MÜHLMANN und H. TIETZ, Höfchen-Briefe *9*, 116 (1956).

$$CH_3C^*ON(C_2H_5)_2 \xrightarrow{POCl_3} CH_3C^*OCH_2C^*ON(C_2H_5)_2 \xrightarrow{SO_2Cl_2} CH_3C^*OCCl_2C^*ON(C_2H_5)_2 + (CH_3O)_3P \longrightarrow (CH_3O)_2\overset{O}{\overset{\|}{P}}-O-\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}{}^*=\overset{Cl}{\overset{|}{C}}-C^*ON(C_2H_5)_2$$

I II III

übliche Markierung solcher Phosphorsäureester mit ^{32}P kann aber deshalb nicht ganz befriedigen, weil, abgesehen von der kurzen Halbwertszeit des ^{32}P nach der Hydrolyse der Ester in die praktisch ungiftigen Alkylphosphorsäuren[7], das weitere Schicksal der phosphorfreien Spaltstücke nicht mehr an Hand von markiertem Material verfolgt werden kann. Gerade diesem Punkt messen wir aber spezielle Bedeutung zu, um so mehr, als Phosphamidon scheinbar sehr stark in die Physiologie der Pflanze eingreift[8].

Da für die toxikologische Bewertung möglicher Abbauprodukte speziell das Schicksal des im Phosphamidon enthaltenen Chlors interessierte, versuchten wir vorerst, Chlor-36 durch einen direkten Austausch, wie er im Falle α,α-Dichlorpropionsäure[9] bereits beschrieben wurde, in das Phosphamidon (III) oder seine Vorstufe, das α,α-Dichloracetessigsäurediäthylamid (II) einzubauen. Die mit Lithiumchlorid-36 in Aceton bei 120° durchgeführte Reaktion verlief beim Phosphamidon negativ und erreichte beim α,α-Dichloracetessigsäurediäthylamid im besten Falle eine Ausbeute von 2,2%.

Für die vorgesehenen Versuche mit markiertem Phosphamidon wurden aber grössere Mengen mit möglichst hoher spezifischer Aktivität benötigt, um auch Spuren von Abbauprodukten erfassen zu können. Deshalb gaben wir der Markierung mit ^{14}C den Vorzug und suchten nach Methoden zur einfachen Einführung von mehreren radioaktiven Zentren. Bei der hydrolytischen Spaltung von Phosphamidon entsteht unter anderem *in vitro* wie auch in der Pflanze[2] ein substituiertes Acetessigsäurediäthylamid. Bekanntlich neigen solche Verbindungen in alkalischem Medium zur Fragmentierung (Säurespaltung) an der 2,3-C–C-Bindung unter Bildung von Essigsäure und substituierten Essigsäurederivaten. Diesem Umstand trugen wir durch die Wahl des Aufbauprinzipes Rechnung, indem wir Phosphamidon an den in Formel III bezeichneten Stellen markierten. Damit ist die Möglichkeit des Erfassens auch von niedermolekularen Abbauprodukten gegeben.

Es gelang uns, ausgehend von ^{14}C-Bariumcarbonat, über 6 Stufen Phosphamidon III[10] in einer Ausbeute von 64% aufzubauen, welches die hohe spezifische Aktivität von 12,1 mC pro g aufwies.

Als Grundlage für die Synthese des Essigsäurediäthylamids dienten uns die Angaben von Murray-Williams[11]. Eine Modifikation der eleganten Methode von Bredereck et al.[12] erlaubte die direkte Kondensation des Essigsäurediäthylamids in Gegenwart von Phosphoroxychlorid zum Acetessigsäurediäthylamid (I) in einer Ausbeute von 95%. Das Säureamid I liess sich mit Sulfurylchlorid in α-Stellung zum α,α-Dichloracetessigsäurediäthylamid (II) chlorieren, welches in siedendem Chlorbenzol mit Trimethylphosphit umgesetzt unter Abspaltung von Methylchlorid Phosphamidon (III) bildete. Durch Verteilung des destillierten Präparates in den Systemen Wasser-Hexan und Wasser-Methylenchlorid und durch nochmalige Destillation im Hochvakuum wurde analysenreines Phosphamidon (III) erhalten. Farblose Flüssigkeit vom Sdp. 120 bis 122°, 10^{-4} Torr, $n_D^{25} = 1{,}4718$, $d_4^{25} = 1{,}2132$. Das IR-Spektrum der Verbindung erwies sich mit demjenigen eines authentischen Präparates[2] als identisch. Banden für P=O 1286, P–O–CH_3 1218, >C=C< 1671 und –$CON(C_2H_5)_2$ 1640 cm^{-1}. Im Papierchromatogramm[3] zeigte die Verbindung eine Reinheit von 99,9%. Rf = 0,39; Fliessmittel: 250 ml Benzin (Sdp. 90–95°), 250 ml Toluol, 350 ml Methanol und 150 ml Wasser (obere Phase); Papier: Whatman Nr. 1.

Summary. The synthesis of C^{14}-labeled phosphamidon, a new systemic insecticide, is described.

R. Anliker, E. Beriger und K. Schmid

CIBA A.G., Basel (Schweiz), 25. Juli 1961.

[7] A. Lehmann, Assoc. Food and Drug Officials U.S., Quart. Bull. *16*, 47 (1952).

[8] Über die Vegetationsbeeinflussung von Phosphamidon wird an anderer Stelle berichtet werden.

[9] C. T. Redemann und R. W. Meikle, Advances in Pest Control Research *2*, 183 (1958).

[10] Über experimentelle Einzelheiten der Synthese vgl. [2].

[11] H. A. Murray und D. L. Williams, *Organic Synthesis with Isotopes*, Part I (New York 1958).

[12] H. Bredereck, R. Gompper und K. Klemm, Chem. Ber. *92*, 1456 (1959).

Synthesis and some Pharmacological Properties of α-Methyltryptamine and its 5-Methoxy Derivative

It is well known that β-phenylethylamines containing a methyl group in α-position of the side chain resist oxidation by monoamine oxidase and often function as inhibitors of this enzyme. There is much evidence that in the series of β-(indolyl-3)-ethylamines the same is true[1,2].

In order to acquire new data, α-methyltryptamine and 5-methoxy-α-methyltryptamine were synthesized and their ability for deamination in comparison with that of their analogs lacking the methyl group in the side chain, as well as the influence of these amines on the activity of the enzyme, were studied.

α-Methyltryptamine and its 5-methoxy derivative were synthesized by a variation of the excellent method developed by Abramovitch and Shapiro[3], which has not been applied so far to the synthesis of tryptamines carrying a substituent in the position mentioned. Ethyl γ-chlorocrotylmalonate[4] prepared by condensation of ethyl malonate with 1,3-dichlorobutene-2 was converted to ethyl γ-ketobutylmalonate[5] by treatment with concentrated sulphuric acid. Catalytic hydrogenation of the derived oxime in the presence of nickel on chromoxide at 100° and 100 atm gave 2-oxo-3-carbethoxy-6-methylpiperidine (I) (yield 44.5%; m.p. 60–62°. Anal. Found: C 58.31, H 8.05, N 7.32. Calc. for $C_9H_{15}O_3N$: C 58.36, H 8.18, N 7.56). Along with (I), a considerable amount of by-products were formed, among which predominantly 6-methylpiperidone-2 arising from decarbethoxylation.

The structure of I was confirmed by alkaline hydrolysis and decarboxylation to 6-methylpiperidone-2[6] and sub-

[1] J. R. Vane, Brit. J. Pharmacol. Chemother. *14*, 87 (1959).

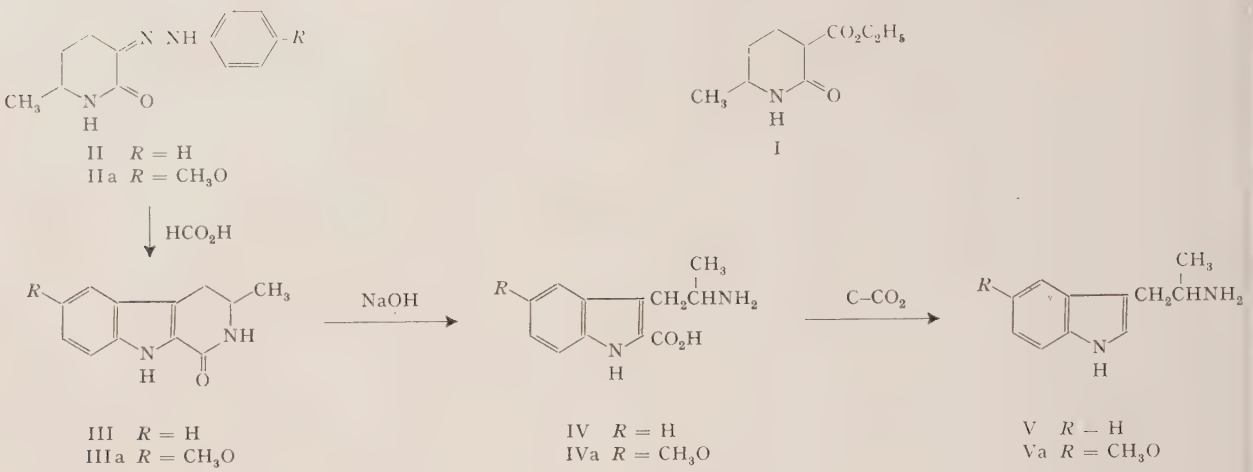
[2] E. I. Kuznetz, V. S. Shashkov, L. S. Ter-Vartanian, M. N. Preobrazhenskaya, N. N. Suvorov, T. P. Sichova, and M. N. Shchukina, Proc. Acad. Sci. USSR *136*, 1231 (1961).

[3] R. A. Abramovitch and D. Shapiro, J. chem. Soc. *1956*, 4589.

[4] O. Wichterle, Chem. Listy *37*, 180 (1943).

[5] C. Mannich and J. P. Fourneau, Ber. dtsch. chem. Ges. *71*, 2090 (1938).

[6] R. Kuhn and D. Jerchel, Ber. dtsch. chem. Ges. *76*, 413 (1943).



sequent lithium aluminium hydride reduction of the latter to *dl*-α-pipecoline[7].

By condensation of I with benzenediazonium chloride and *p*-methoxybenzenediazonium chloride at pH 5 the phenylhydrazones (II) (yield 77.5%; m.p. 220–221°. Anal. Found: C 66.05, H 7.20, N 19.24. Calc. for $C_{12}H_{15}ON_3$: C 66.35, H 6.91, N 19.35) and (IIa) (yield 53.5%; m.p. 205°. Anal. Found: C 63.52, H 6.88, N 17.16. Calc. for $C_{13}H_{17}O_2N_3$: C 63.13, H 6.88, N 17.00) were obtained. These were cyclized by boiling with 80% formic acid to 3-oxo-5-methyl-3, 4, 5, 6-tetrahydro-4-carboline (III) (yield 79.7%; m.p. 218–219°. Anal. Found: C 72.22, H 6.00, N 14.27. Calc. for $C_{12}H_{12}ON_2$: C 72.00, H 6.00, N 14.00) and its 10-methoxy derivative (IIIa) (yield 86.8%; m.p. 263°. Anal. Found: C 67.95, H 6.33, N 12.13. Calc. for $C_{13}H_{14}O_2N_2$: C 67.82, H 6.09, N 12.17). Hydrolysis by methanolic potassium hydroxide to the amino-acids (IV) (yield 81.6%; m.p. 256° (decomp.). Anal. Found: C 66.43, H 6.44, N 12,58. Calc. for $C_{12}H_{14}O_2N_2$: C 66.04, H 6.42, N 12.84) and (IVa) (yield 69.7%; m.p. 252–254° (decomp.). Anal. Found: C 62.82, H 6.52, N 10.95. Calc. for $C_{13}H_{16}O_3N_2$: C 62.90, H 6.45, N 11.28) and subsequent decarboxylation effected by boiling with 10% hydrochloric acid yielded the desired α-methyltryptamine[8] (V) (yield 69.1%; m.p. 98–99°; hydrochloride, m.p. 203–204°; picrate, m.p. 220–221°) and 5-methoxy-α-methyltryptamine[9] (Va) (yield 68.1%; m.p. 100–101°; hydrochloride, m.p. 210°; picrate, m.p. 197°).

The deamination of these compounds by rat brain monoamine oxidase *in vitro* and their action on enzyme activity in mice *in vivo* have been studied.

Brain homogenates have been prepared in 0.15 *M* phosphate buffer (pH 7.23) centrifugated and supernatant layer was incubated with substrate for 1 h at 37°.

The deamination was compared with that of tryptamine. In the *in vivo* experiments in mice the drugs were injected subcutaneously (10 and 50 mg/kg) 20 min before sacrificing. For comparison tryptamine was taken as substrate.

As a measure of deamination nitrogen was determined by Conway's method photoelectrocolorimetrically.

The results obtained are listed in the Table.

α-Methyltryptamine and its 5-methoxy derivative are not deaminated by rat brain monoamine oxidase (the first column of figures in the Table). These data are in agreement with those received by other investigators[2].

In vivo α-methyltryptamine did not inhibit the activity of monoamine oxidase of mice brain. It is interesting, on the other hand, that the brain homogenates of mice receiving 5-methoxy-α-methyltryptamine exceed the deaminating activity of the control groups (the second column of figures in the Table). Whether this effect is due to enzyme activation requires further investigation.

Compound	Amount of N_2 in γ[a]	Amount of N_2 in γ[b] 10 mg/kg	50 mg/kg
Tryptamine	1.8 ± 0.02		
α-Methyltryptamine V	1.1 ± 0.035	2.0[d]	2.2[d]
5-Methoxytryptamine	1.93 ± 0.035		
α-Methyl-5-methoxy-tryptamine Va	1.07 ± 0.09	2.75 ± 0.05[c]	2.9[c]
0.05 ml distilled water	1.1 ± 0.2		
Saline 0.1 ml/10 g		2.2 ± 0.1[c]	

[a] Mean value of 3 experiments. [b] Drugs were injected in doses of 10 and 50 mg/kg 20 min before sacrificing. 5 mice for each experiment. [c] 2 experiments. [d] 1 experiment.

Résumé. L'α-méthyltryptamine et le 5-méthoxy dérivé ont été synthétisés en utilisant une variante de la méthode d'ABRAMOVITCH et SHAPIRO.

Des expériences *in vitro* ont montré que ces deux amines ne subissent pas de désamination par la monoaminoxydase du cerveau des rats blancs. La 5-méthoxy-α-methyltryptamine injectée aux souris blanches en dose de 10 mg/kg semble accroître l'activité de la monoaminoxydase du cerveau.

A. G. TERZIAN, R. R. SAFRASBEKIAN, R. S. SUKASIAN, and G. T. TATEVOSIAN

Institute of Fine Organic Chemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan (USSR), June 5, 1961.

[7] W. H. TALLENT, V. L. STROMBERG, and E. C. HORNING, J. Amer. chem. Soc. *77*, 6361 (1955).

[8] A. S. F. ASH and W. R. WRAGG, J. chem. Soc. *1958*, 3887.

[9] S. PIETRA and G. TACCONI, Farmaco (Pavia), Ed. sci. *13*, 893 (1958).

Untersuchungen an Ionenaustauschmodellen zum Verständnis der Physiologie biogener Amine. Austauschgleichgewichte zwischen Natrium und Aminen an schwefelsäure- und karboxylgruppentragenden Ionenaustauschern

In vorangegangenen Arbeiten haben wir auf mögliche biologische Funktionen von Makromolekülen, speziell von sauren Polysacchariden, hingewiesen. Verschiedene spezifische Reaktionsabläufe, bei denen solche Makromoleküle beteiligt sind, können auf ihren Polyelektrolytcharakter zurückgeführt und damit als Folgen eines Ionenaustauschvorganges gedeutet werden[1-3]. Auch Higginbotham und Dougherty[4] weisen auf die Austauschfunktion von Mucopolysacchariden hin, die sie unter gewissen Umständen befähigt, toxische Produkte zu entgiften. In unseren bisherigen Versuchen wurden zur Hauptsache Austauschreaktionen an sauren synthetischen Ionenaustauschern verfolgt, um daraus gewisse Aufschlüsse über pharmakodynamische Reaktionsabläufe zu erhalten, bei denen saure Polysaccharide eine Rolle spielen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass solche Modellversuche es gestatten, Verbindungen verschiedenster pharmakodynamischer Charakteristik im Hinblick auf ihre möglichen histamin-freisetzenden Eigenschaften näher zu definieren[3]. Da unter physiologischen Bedingungen Amine an Polyelektrolyten nicht nur mit anderen Aminen biogener oder exogener Herkunft, sondern auch mit anorganischen Kationen in Wechselbeziehung treten dürften, lag es nahe, zu untersuchen, in welchem Masse das Verhalten einer Anzahl Amine an synthetischen Ionenaustauschern durch gleichzeitiges Angebot eines der biologisch wichtigen Kationen (Natrium) beeinflusst wird. Mit den gewählten Versuchsbedingungen wurde nicht in erster Linie die Aufstellung einer Selektivitätsreihe im streng physikalischen Sinne angestrebt; sie sollten vielmehr dazu dienen, die Verteilung von Natrium, Wasserstoff und Amin am Ionenaustauscher zu erfassen, um Hinweise auf gewisse pharmakodynamische Austauschphänomene zu gewinnen.

Bei unseren Versuchen wurden zwei verschiedene saure Kationenaustauscher (Dowex 50 W × 2 und Amberlite IRC 50 mit schwefelsauren bzw. mit Carboxyl-Gruppen als aktiven Zentren) verwendet, wobei eine definierte Menge Harz (Kapazität = 10×10^{-4} Val) mit äquivalenten Anteilen von NaOH und Aminhydrochlorid (gelöst in 20 ml Wasser) ins Gleichgewicht gebracht wurde. Die potentiometrische Titration der Lösung nach dem Austausch ergab (auch Zusatz von Dioxan) mit $n/10$ HCl den Anteil freier Aminbase entsprechend dem Wasserstoffanteil auf dem Austauscher und mit $n/10$ NaOH die Gesamtvale des in der Aussenlösung befindlichen ungebundenen Amins.

Aus den ermittelten Werten wurde durch Differenzberechnung die Verteilung der einzelnen Ionen auf dem Austauscher bestimmt. Daraus lässt sich eine Aktivitätsreihe aufstellen, wobei der Wert angibt, wieviel von 100 sauren Gruppen des Ionenaustauschers vom jeweiligen Amin neben Natrium und Wasserstoff belegt sind (siehe Tabellen I und II).

Zunächst zeigt sich, dass die pH-Werte der Gleichgewichtslösungen in beiden Systemen variieren. Dies ist auf Grund der gewählten Versuchsbedingungen durchaus verständlich, da jeder Ionenaustauscher eine mehr oder weniger starke Affinität zu H^+-Ionen aufweist oder in Form von undissoziierten Gruppen vorliegt, so dass der entsprechende Anteil des Amins als Base in gelöster Form oder als Bodenkörper auftritt. Im Rahmen unserer Problemstellung dürfte dieser Faktor jedoch vorerst nicht von Bedeutung sein, da wohl auch im Organismus gewisse pH-Schwankungen an Zellstrukturen denkbar sind. Neue Versuchsreihen dieser Art bei physiologischem pH-Wert sind im übrigen vorgesehen.

Die bisherigen Untersuchungen weisen bereits auf wesentliche Unterschiede des Verhaltens von Aminen an ver-

Tab. I. Austauschgleichgewicht am Ionenaustauscher Dowex mit Schwefelsäuregruppen als aktiven Zentren

Amin · HCl	Aktivitätsreihe[a] %	Äquivalentverteilung auf dem Harz ($\times 10^{-4}$ Val) Amin	Wasserstoff	Natrium	Gleichgewichts-pH der Lösung
d-Glucosamin	47,9	4,79	0,21	5,00	6,1
Compound 48/80[b]	61,9	6,19	0,10	3,71	5,1
Xylocain[c]	71,2	7,12	0,43	2,45	7,0
Priscol	73,6	7,36	0,32	2,32	9,1
Mezcalin	75,2	7,52	0,25	2,23	8,7
Histamin	80,7	8,07	0,17	1,76	5,4
Regitin	83,2	8,32	0,38	1,29	8,3
Tryptamin	86,1	8,61	0,20	1,19	8,9
Pyribenzamin	87,8	8,78	0,29	0,93	8,0
Otrivin	88,9	8,89	0,18	0,93	9,0
Antistin	90,4	9,04	0,17	0,79	8,6
n-Octylamin	90,8	9,08	0,13	0,79	8,2
Privin	93,2	9,32	0,17	0,51	9,0
Nupercain	96,5	9,65	0,06	0,29	6,2
Spermin	97,3	9,73	0,13	0,14	7,0

[a] Vom Harz zurückgehaltener Aminanteil.

[b] Herrn Dr. A. C. White, Wellcome Research Laboratories, Beckenham (England), danken wir für die Überlassung einer Versuchsmenge.

[c] Die Substanz wurde uns freundlicherweise von der Firma Astra, Södertälje (Schweden), zur Verfügung gestellt.

Tab. II. Austauschgleichgewichte am Ionenaustauscher Amberlite mit Carboxylgruppen als aktiven Zentren

Amin · HCl	Aktivitätsreihe[a] %	Äquivalentverteilung auf dem Harz ($\times 10^{-4}$ Val) Amin	Wasserstoff	Natrium	Gleichgewichts-pH der Lösung
Xylocain	18,3	1,83	3,59	4,58	7,7
Nupercain	22,3	2,29	6,94	0,77	7,2
Compound 48/80	25,6	2,56	0,79	6,65	8,1
Priscol	29,3	2,93	1,56	5,51	8,9
Privin	35,9	3,59	3,59	2,82	8,8
d-Glucosamin	37,0	3,70	2,54	3,76	7,2
Mezcalin	37,0	3,70	1,64	4,66	9,0
Regitin	37,9	3,79	5,36	0,85	8,2
Otrivin	39,4	3,94	2,69	3,37	9,7
Pyribenzamin	49,4	4,94	2,19	2,87	8,3
Antistin	54,2	5,42	1,71	2,87	8,8
Tryptamin	65,0	6,50	0,91	2,59	9,3
Histamin	68,3	6,83	1,50	1,67	7,1
n-Octylamin	85,1	8,51	0,11	1,38	8,6
Spermin	92,9	9,29	0,16	0,55	7,1

[a] Vom Harz zurückgehaltener Aminanteil.

[1] R. Jaques und K. Küttner, Helv. physiol. Acta *19*, Heft 3 (1961), im Druck.

[2] K. Küttner, Dissertation Bern (1961).

[3] K. Küttner, H. Majer, G. Huber und R. Jaques, Exper. *17*, 371 (1961).

[4] R. D. Higginbotham und T. F. Dougherty, Fed. Proc. *16*, 58 (1957).

schiedenartigen Kationenaustauschern hin, die unter anderem auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Organspezifität gewisser Amine abgeben. Ein synthetischer Ionenaustauscher mit Sulfosäuregruppen als aktiven Zentren vermag in Gegenwart einer äquivalenten Menge Natriumionen Amine im allgemeinen sehr bevorzugt einzutauschen, wobei von den gewählten Aminen nur *d*-Glucosamin schwächer als Natrium festgehalten wird. Entsprechend diesen Modellversuchen ist anzunehmen, dass auch physiologische makromolekulare Polyelektrolyte, die – wie etwa Heparin – ähnlich aktive Zentren besitzen, im Organismus mit Aminen biogener oder exogener Natur in stärkere Wechselbeziehung treten können als mit anorganischen Kationen.

Ganz andere Verhältnisse finden sich jedoch am sauren Ionenaustauscher mit Carboxylgruppen als aktiven Zentren. Hier werden die Amine ganz unterschiedlich stark eingetauscht; die Natriumionen spielen eine sehr wichtige Rolle und werden zum Teil bedeutend stärker aufgenommen. Analog zu diesen Befunden können wohl Carboxylgruppen tragende Organstrukturen, wie sie etwa in neuraminsäurehaltigen Grenzflächen vorliegen, nur mit gewissen Aminen bevorzugt in Wechselbeziehung treten, währenddessen andere Amine infolge des Einflusses anorganischer Kationen weniger selektiv aufgenommen werden.

Ein Vergleich der Aktivitätsreihen der beiden Harze zeigt ausserdem, dass gewisse Amine in den beschriebenen Systemen sehr unterschiedlich stark eingetauscht werden können: So wird beispielsweise Mezcalin vom Sulfosäureharz mit 75,2% ausgesprochen bevorzugt festgehalten. Seine Aufnahme am Karboxylgruppenharz ist mit 37% geringer als die der Natriumionen mit 46,6%.

Angesichts der Häufigkeit von biogenen Makromolekülen mit Polyelektrolytcharakter dürften im Organismus Ionenaustauschvorgänge, sei es an Depot- oder an Rezeptorstrukturen, eine bedeutsame Rolle spielen, wobei die biogenen Ionenaustauschsysteme – in ähnlicher Weise wie die von uns verwendeten Harze – ihre spezifische Funktion vor allem der Art ihrer ladungstragenden Gruppen verdanken.

Summary. The influence of an inorganic cation (sodium) was studied upon the distribution of physiologically or pharmacologically important amines on two different acid ion exchangers. When cation and amine are added in equivalent amounts to an exchange system of corresponding capacity, the distribution pattern of the amine shows differences which are characteristic of the active groups (SO_3H, COOH) of the relevant exchanger. Such reactions are thought to be of importance in biological activities of polyelectrolytes.

K. KÜTTNER, G. HUBER und R. JAQUES

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz), 14. August 1961.

Calcification of the Parathyroids Induced by Calciphylaxis[1]

Calciphylaxis is a condition of hypersensitivity in which during a 'critical period' after sensitization by a systemic calcifying factor (e.g., vitamin-D compounds, parathyroid hormone), treatment with certain challengers (e.g. metallic salts), causes an acute local tissue calcification followed by inflammation and sclerosis. A topical calciphylaxis thus induced by subcutaneous injection of challengers results in a cutaneous calcinosis reminiscent of calcareous scleroderma. However, in suitably sensitized (e.g., dihydrotachysterol-treated) rats, calciphylactic reactions can also be elicited rather selectively at predetermined sites (e.g. in the pancreas, bile ducts, uterus, spleen, Kupffer cells, lungs, salivary glands, lacrimal glands) by the intravenous administration of challengers that have a particular affinity for one or the other organ[2-4].

Here we should like to report on the production of an almost selective parathyroid calcification by the use of chromium salts as calciphylactic challengers.

Materials and Techniques. Fifty female Holtzman rats with an initial body weight of 105 g (range 100–110 g) were subdivided into five equal groups treated as follows: Group 1: Dihydrotachysterol (DHT); Group 2: $CrCl_2$; Group 3: $CrCl_3$; Group 4: DHT + $CrCl_2$; Group 5: DHT + $CrCl_3$. DHT (Calcamin®, Wander) was given at the dose of 1 mg in 0.5 ml corn oil by stomach tube once on the first day. Chromous chloride ($CrCl_2$, 3.5 mg in 0.35 ml of water) and chromic chloride ($CrCl_3 6H_2O$, 10 mg in 1 ml water) were injected intravenously once on the second day. All animals were killed with chloroform on the sixth day. After inspection with a stereoscopic loupe, specimens of various organs were fixed in alcohol-formol for the subsequent histochemical demonstration of calcium by the v. Kóssa technique.

Results. At autopsy, the most striking finding was the intense calcification of the parathyroids. The rat possesses

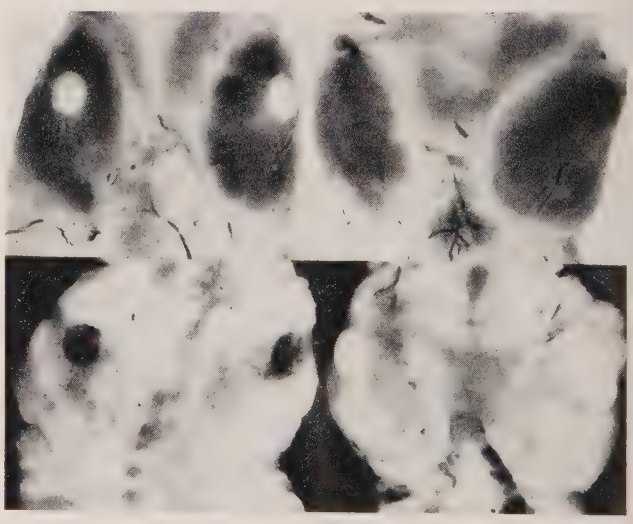


Fig. 1. Selective calcification of the parathyroids, in two rats sensitized with DHT. In addition, one (left) received $CrCl_3$. The calcified parathyroids are white in the fresh (top) and black in the $AgNO_3$-stained specimen (bottom).

[1] This work was supported by the National Institute of Health, U.S. Public Health Service (Grants Nos. A-1641/C3, B-2037/C2, and H-6182) and by the Office of the Surgeon General, U.S. Army Medical and Research Command, Contract No. DA-193-MD-2039.

[2] H. SELYE, P. JEAN, and R. VEILLEUX, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *104*, 409 (1960).

[3] H. SELYE and K. NIELSEN, Acta morphol., Acad. Sci. Hungar. *10*, 327 (1961).

[4] H. SELYE, Allergie und Asthma, in press.

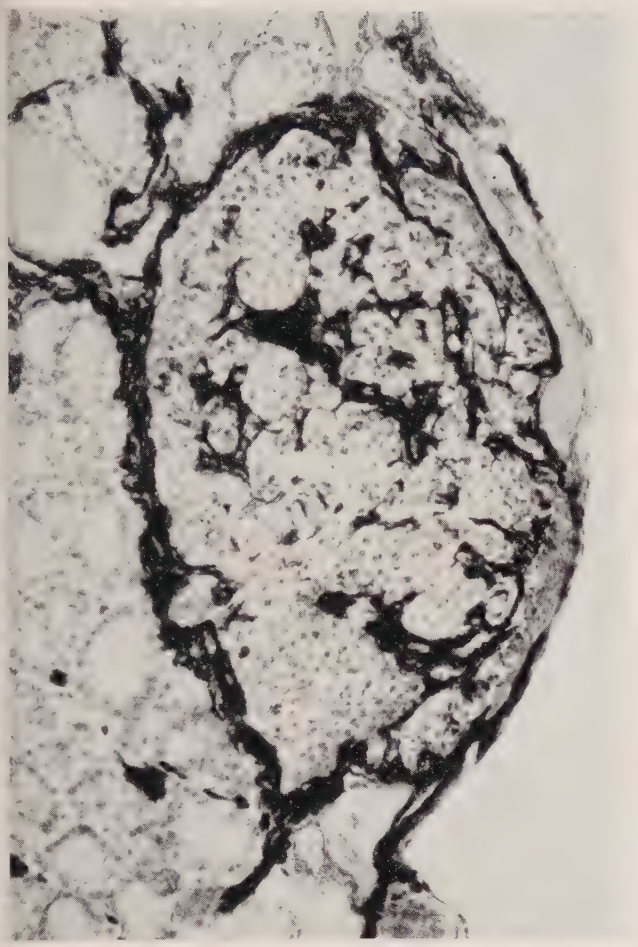


Fig. 2. Histologic aspect of the calcified parathyroid, showing selective deposition of calcium salts in the stroma of the parathyroid, with slight spreading into the adjacent thyroid stroma. The parenchymal cells are unaffected (von Kóssa × 150).

only two parathyroids which are embedded near the posterior margin of the thyroid. Normally, it is difficult to distinguish them from the surrounding thyroid tissue. Neither DHT alone (Group 1) nor the chromium salts alone (Group 2 and 3) altered the appearance of the glands but after treatment with $CrCl_2$ or $CrCl_3$ following DHT sensitization (Group 4 and 5), the parathyroids could easily be distinguished from the surrounding reddish-brown thyroid tissue as brilliant white nodules. On defatted specimens stained with the $AgNO_3$ technique, these parathyroids were selectively blackened, thereby suggesting that the calcium was presumably deposited in the form of silver reducing phosphates (Figure 1). Previous observations had shown that in various organs (e.g. pancreas, salivary glands), calcium deposition induced by calciphylaxis is almost invariably limited to the stroma[4]. This proved to be the case also in the present experiments. The parathyroid parenchyme remained free of calcium but the stroma was heavily impregnated with v. Kóssa positive material which tended to spread even into the stroma of the surrounding thyroid (Figure 2).

In groups 4 and 5, varying degrees of connective tissue calcification were also noted within the salivary and Brunner's glands, pancreas, renal cortex, diaphragma and pulmonary septa. The calcification was most intense and most selectively limited to the parathyroids in group 5. However, this fact is no proof of a fundamental difference in the action of the two chromium salts since $CrCl_3$ makes a perfect solution, while $CrCl_2$ forms a poorly tolerated suspension at the dose level used and hence could not be given at the same dose level as the $CrCl_3$.

Résumé. Une calcification des glandes parathyroïdes a été réalisée chez le rat par sensibilisation avec une dose orale unique de dihydrotachystérol suivie, le lendemain, d'une seule injection intraveineuse de $CrCl_2$ ou $CrCl_3$.

H. Selye and J.-M. Dieudonné

Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal (Canada), June 30, 1961.

Free Radicals in Animal Tissues

The recent work of Commoner, Lippincott, and Passoneau[1], on free radicals associated with enzyme systems, and Gordy, Ard, and Shields[2] on irradiation of compounds of biochemical significance, represents two approaches to the analysis of free radicals in biological materials using electron spin resonance techniques.

In order to correlate free radical concentrations with the metabolic activity of tissues under different conditions, we have examined the free radical concentration of various whole tissues. As lyophilization has been shown to cause the production of unpaired electrons[3], liquid nitrogen temperatures were used to trap and stabilize free radicals in tissue samples. The tissues were thus frozen but kept hydrated.

Fresh tissues were removed as quickly as possible from freshly killed Norway Rats, and packed into silica glass tubes with an internal diameter of 4 mm, and immediately cooled to 77 K. Absorption of microwave power was analysed at a carrier wave frequency of 9000 Mc/s and a magnetic field of 3000 Gs. The concentration of free radicals was determined by comparison with the absorption curves obtained from a standard carbon sample. Figure 1 shows the pattern of signals obtained from heart,

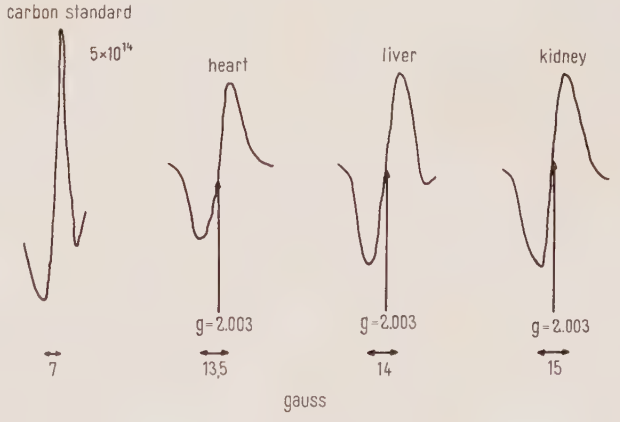


Fig. 1. The signals obtained from a carbon standard (5.1×10^{14}), rat heart muscle; rat liver, and rat kidney.

[1] B. Commoner, B. B. Lippincott, and J. V. Passoneau, Proc. Nat. Acad. Sci. *44*, 1099 (1958).

[2] W. Gordy, W. B. Ard, and H. Shields, Proc. Nat. Acad. Sci. *41*, 983 (1955).

[3] F. K. Truby and J. W. Goldzeiher, Nature *182*, 1371 (1958).

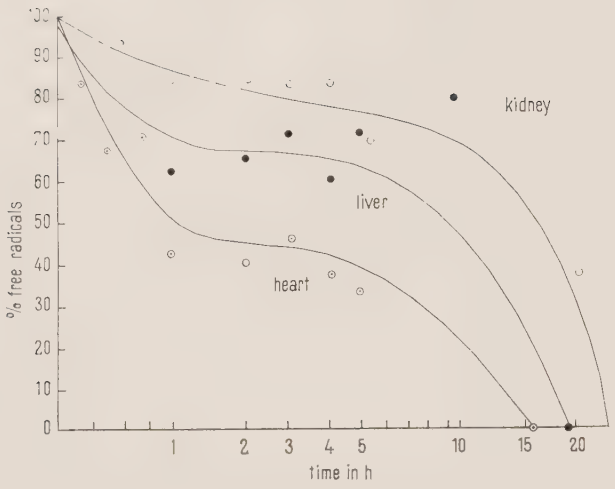


Fig. 2. Decay of free radical concentration at room temperature. The % of free radicals is taken as 100% at the first sample, after rapid removal from the animal. They are then left to decay at room temperature and the % of free radicals determined at specific time intervals.

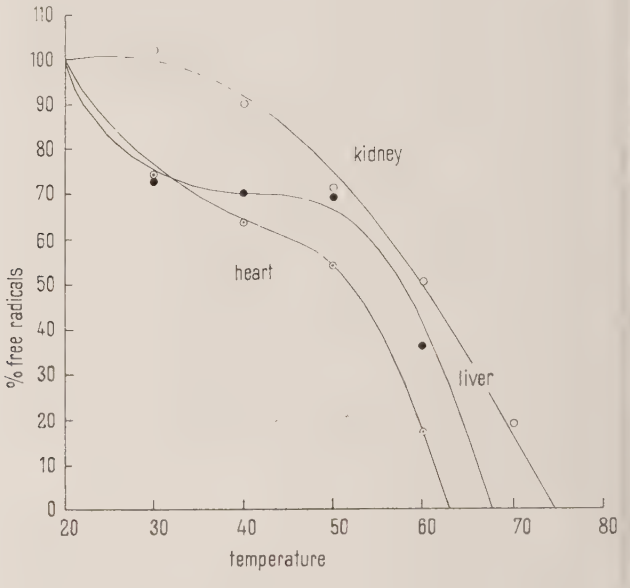


Fig. 3. The effect of temperature on the development and decay of free radicals. The samples are removed from the animal and kept at a specified temperature for 15 min. The concentration of free radicals is then determined, and plotted here with the 20°C taken as 100%.

liver, and kidney, together with a carbon sample containing 5.1×10^{14} free radicals. The signals obtained from the three tissues are clearly much alike. They all have g values of 2003, and d for heart is 13.5, whilst that for liver is 14.0, and kidney 15.0.

The rate of decay of the signals of specimens kept at room temperature (18°C) varied according to the tissue used. The signal from heart decayed rapidly over the first hour after removal from the animal, and thereafter persisted for up to 16 h. Free radicals were detectable for up to 24 h in kidney and 20 h in liver (Figure 2).

In a study of the effect of temperature on the initial free radical concentrations, each tissue was kept at a constant temperature for 15 min and then immersed in liquid nitrogen. There was an optimum free radical production at 20–30°C and the radicals in the kidney persisted up to 75°C. No signal was detectable from heart or liver above 65°C (Figure 3). The effect of temperature on the development and decay of free radical concentrations appears to be characteristic and specific for a given system. Though the shape of the radicals in all three systems appears to be similar, the decay and development rate indicates that those in the heart, liver and kidney are probably in different systems in the tissues[4].

Résumé. L'auteur décrit les radicaux libres présents dans des tissus congélés du rein, du foie et du cœur du rat. Les taux de décomposition et les effets de la température sur la stabilité des indices montrent qu'il y a probablement dans ces tissus plusieurs systèmes de radicaux libres.

G. A. Kerkut, M. L. Edwards, K. Leech, and K. A. Munday

Department of Physiology and Biochemistry, Department of Electronics, The University of Southampton (England), July 21, 1961.

[4] We are indebted to the Medical Research Council for financial aid in this research.

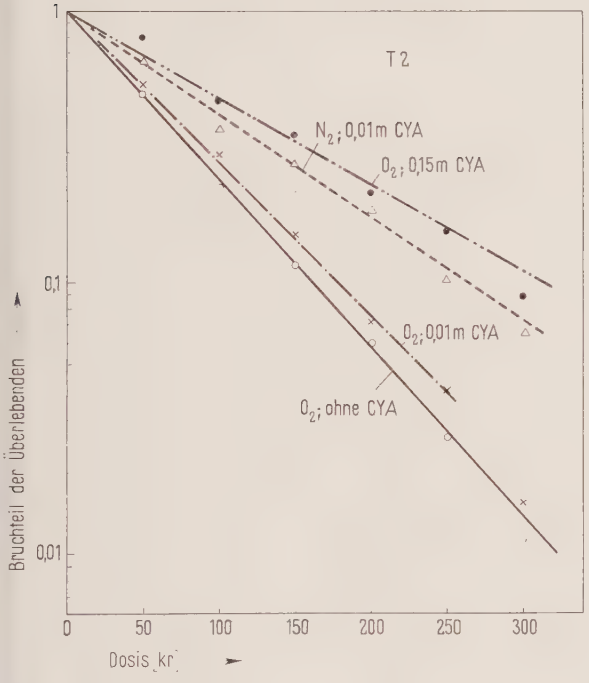
Cysteamin-Sauerstoff-Antagonismus bei der Strahlenwirkung auf T2-Bakteriophagen

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen über die Schutzwirkung von Cystein[1–4] oder Cysteamin[4–6] gegenüber sogenannten direkten Röntgenstrahleneffekten auf suspendierte Bakteriophagen durchgeführt wurden, war bisher keine einheitliche Deutung der Resultate erkennbar. So fanden Marcovich[5] und Howard-Flanders[6] beim Phagen T2 nach Cysteaminzugabe *keinen* Schutzeffekt, wenn Sauerstoff während der Bestrahlung anwesend war. Dies schien im Widerspruch zu den Befunden von Hotz und Müller[4] zu stehen, die sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen den gleichen Schutzfaktor beobachten konnten. Die hier mitgeteilten Ergebnisse ermöglichen es nun, eine einfache Erklärung für diese nicht ohne weiteres verständlichen Unterschiede zu geben.

Die in früher[7] beschriebener Weise gereinigten und titrierten Konzentrate des Coliphagen T2 (wild) enthielten zwischen 10^{10} und 10^{12} plaquebildende Einheiten pro ml Phagenpuffer. Diese Stammsuspensionen wurden zum

[1] A. H. Doermann, zitiert bei J. D. Watson, J. Bacteriol. *63*, 473 (1952).
[2] H. T. Epstein und D. Schardl, Nature *179*, 100 (1957).
[3] G. Hotz und A. Müller, Z. Naturforschg. *15b*, 450 (1960).
[4] G. Hotz und A. Müller, Z. Naturforschg. *16b*, 282 (1961).
[5] H. Marcovich, Radiation Res. *9*, 149 (1958).
[6] P. Howard-Flanders, Nature *186*, 485 (1960).
[7] A. Müller, G. Hotz und K. G. Zimmer, Z. Naturforschg., im Druck.

Versuch 1:10 in Difco Nährbouillon (4%) ohne bzw. mit einem Zusatz von Cysteamin (Fa. Fluka, Schweiz) bei pH 7 verdünnt. Bei Bestrahlung in schutzstoffhaltigen Suspensionen liessen wir diese vor Bestrahlungsbeginn 10 min bei Zimmertemperatur auf die Phagen einwirken. Zur Bestrahlung wurden 0,6 ml der Phagensuspension in Plexiglasschälchen von 20 mm Durchmesser abgefüllt. Der mehrfach beschriebene Einfluss des Sauerstoffs auf die Strahlenempfindlichkeit cysteamingeschützter T2-Phagen[4–6] machte es erforderlich, unter kontrollierten Gasbedingungen zu bestrahlen. Mittels eines kleinen Gebläses wurde die Suspension vor und während der Bestrahlung durchmischt und auf diese Weise gleichzeitig mit Sauerstoff oder gereinigtem Stickstoff äquilibriert. Eine Röntgenröhre mit Berylliumfenster von 1,5 mm Stärke gab bei 100 kV_s und 25 mA am Ort der Suspension eine Dosisleistung von 500 kr/min bei einer effektiven Wellenlänge von 1,4 Å. Die in der Phagensuspension absorbierte Strahlenenergie wurde in der gleichen Geometrie mit dem Fricke-Aktinometer ($Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$) gemessen. Als Kriterium des Strahleneffektes wurde die Plaquebildungsfähigkeit gewählt.



Überlebensrate von T2-Bakteriophagen in 4% Difco-Nährbouillon nach Röntgenbestrahlung unter verschiedenen Bedingungen.

Die Figur veranschaulicht den Einfluss von Sauerstoff während der Röntgenbestrahlung auf die Neigung der Dosis-Effektkurve bei in Cysteaminbouillon suspendierten Phagen T2. Alle experimentellen Daten lassen sich im halblogarithmischen Raster durch Gerade darstellen. Die Neigungsdifferenz der Geraden für Bestrahlung *ohne* Cysteamin und mit 0,01 m Cysteamin (beide Versuche unter O_2) liegt innerhalb der Fehlergrenzen, das heisst, bei Anwesenheit von Sauerstoff bewirkt 0,01 m Cysteamin keinen Schutz. Unter Stickstoff (das ist bei Ausschluss von Sauerstoff) liefert Zusatz von m/100 Cysteamin zur Bouillon eine Schutzwirkung entsprechend einem Dosisreduktionsfaktor von 1,6[8]. Praktisch der gleiche Schutzeffekt ergibt sich auch unter Sauerstoff nach Erhöhen der Cysteaminkonzentration auf 0,15 m; die Neigungen der entsprechenden Kurven unterscheiden sich um weniger als 10%.

Wendet man den von Howard-Flanders für Bakteriophagen vorgeschlagenen Konkurrenzmechanismus zwischen Sauerstoff und Wasserstoff-Donatoren in Form der Schutzmoleküle um strahleninduzierte freie Radikale in den Phagen auf unsere Ergebnisse an, so ergeben sich zwanglos folgende Schlüsse: Bei Zugabe von Cysteamin zur Bestrahlungsbouillon in Konzentrationen von $\leqq$ m/100 gelingt es den Wasserstoff-Donatoren nicht, in Konkurrenz mit den Sauerstoffmolekülen zu treten, die in einer O_2-gesättigten Bouillon überwiegen. Wird dagegen die Cysteaminkonzentration um etwa eine Grössenordnung erhöht, so ist das Gleichgewicht zugunsten der Wasserstoff-Donatoren verschoben, und es kommt zur Reparierung der etwa als strahleninduzierte Carbonium-Radikale angenommenen latenten Strahlenschäden. Abgesehen von der Aufklärung der oben erwähnten scheinbaren Widersprüche, die beim Vergleich von Versuchsergebnissen aus verschiedenen Arbeitskreisen auftraten, scheinen die hier mitgeteilten Ergebnisse geeignet zu sein, das Verständnis für den Schutzmechanismus sulfhydrylhaltiger Verbindungen bei suspensierten röntgenbestrahlten Bakteriophagen zu vertiefen.

Summary. T2 phage suspended in broth and irradiated in the presence of cysteamine in high concentration is protected against the action of X-rays equally well under oxygen as under nitrogen. Low concentrations of cysteamine, however, give protection under nitrogen only. These results resolve apparant contradictions in earlier work and lend support to the mechanism of reaction as proposed by Howard-Flanders.

G. Hotz

Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe (Deutschland), 10. Juli 1961.

[8] G. Hotz und A. Müller, Z. Naturforschg., im Druck.

The Properties of an Arginine Auxotroph of *Salmonella typhimurium*

There are few reports in the literature of arginine auxotrophs of Salmonella. Iseki and Kashiwagi[1] obtained an arginine-requiring mutant following treatment of a *Salmonella paratyphi* B strain with nitrogen mustard. Stokes and Bayne[2] reported a naturally occurring strain of *S. paratyphi* A with a multiple requirement for guanine, cysteine and arginine. Gowen et al.[3] used two mutants of *S. typhimurium* strain 533 which had multiple requirements that included arginine, and Miyake and Demerec[4] mentioned an arginine auxotroph in the LT-7 mutator strain of *S. typhimurium*.

More recently Lahr[5,6] has described 39 arg$^-$ mutants of *S. typhimurium*, of which 27 were induced in strain LT-2 by 2-aminopurine.

[1] S. Iseki and K. Kashiwagi, Proc. Japan Acad. *33*, 486 (1957).
[2] J. L. Stokes and H. G. Bayne, J. Bacteriol. *76*, 417 (1958).
[3] J. W. Gowen, J. Stadler, H. H. Plough, and H. Y. Miller, Genetics *38*, 531 (1953).
[4] T. Miyake and M. Demerec, Nature *183*, 1586 (1959).
[5] E. L. Lahr, Carn. Inst. Wash. Yr. Bk. *59*, 438 (1960).
[6] E. L. Lahr, personal communication (1961).

The present report describes an arginine auxotroph isolated in *S. typhimurium* strain LT-22. Auxotroph G-12 was the only mutant which responded to arginine to be isolated in numerous experiments with untreated, ultraviolet-irradiated, and $MnCl_2$-treated cells of *S. typhimurium* strains LT-22 and SW-578. The mutant was isolated in an experiment in which stationary phase cells from an aerated nutrient broth culture of LT-22 were treated with $MnCl_2$[7], grown in broth, screened with penicillin, then plated on mineral medium A[8] supplemented with a limiting concentration of *L*-arginine (1 µg/ml). Arginine auxotroph G-12 was found among the minute colonies which developed alongside the larger, prototrophic, colonies.

Auxotroph G-12 responded only *L*-arginine and showed no growth response to ornithine or citrulline. It was not inhibited by excess *L*-lysine and grew well on complex media. Growth, as measured by colonial diameter on minimal A plates was proportional to *L*-arginine concentration as shown in Figure 1.

Since G-12 was the sole arg$^-$ mutant isolated from penicillin selection experiments it was of interest to see if G-12 itself survived exposure to penicillin screening. Washed cells of broth cultures of G-12 and the LT-22 prototroph were inoculated separately into tubes of liquid minimal medium A containing 50 i.u. penicillin per ml and incubated at 37°. Samples were plated for assays of viable count after 12–24 h of incubation. The results are shown in Figure 2 from which it can be seen that G-12 arg$^-$ cells survived some 50 times better than prototrophic cells. Approximately 56% of the G-12 cells were still viable after 18 h of penicillin screening.

Since mutations to arginine requirement appeared to be rare, tests were made to determine if reverse mutations back to arginine independence (arg$^-$ → arg$^+$) also occur infrequently. In an experiment designed to measure the rate of spontaneous reversion to arginine independence, no reversions were found among 5.45×10^9 cells from 24 independent broth cultures. During the period of growth in broth the G-12 cells had undergone some 28 divisions. Thus, spontaneous reversions to the arg$^+$ conditions must occur at a low rate.

When cells from a broth culture of G-12 were irradiated with ultraviolet light to 11.3% survival, then incubated on minimal A plates supplemented with 1% liquid nutrient broth[9], arg$^+$ reversions arose at the rate of 0.3 per 10^6 survivors. Figure 3 shows UV-induced reversions of G-12 on limitedly enriched minimal A medium. Manganous chloride treatment to 63% survival gave 0.05 arg$^+$ reversions per 10^6 survivors. Nitrous acid treatment gave no reversions over a wide range of survival values.

Using the spot testing method of Iyer and Szybalski[10] the effect of chemical mutagens upon G-12 was ascertained. Negative results were obtained with di-epoxybutane, Caffeine, 5-bromouracil + aminopterin, and H_2O_2 + HCHO. β-propiolactone gave a few reversions, and numerous reversions were obtained after treatment with ethyl methane sulphonate as shown in Figure 4.

Transductional tests were carried out using the temperate bacteriophage PLT-22 grown on prototrophic bacteria. G-12 was infected at a multiplicity of 20 and plated on limitedly enriched minimal A. Transductions to arg$^+$ occurred at a rate of 1 per 10^7 phage particles.

Attempted hybridizations of G-12 with other enteric bacteria were performed using mixed cultivation in broth followed by plating on selective media[4], and by cross replication onto selective media[11]. Negative results were obtained in all attempted matings of G-12, and of a spontaneous rough colony variant of G-12, with *Esche-*

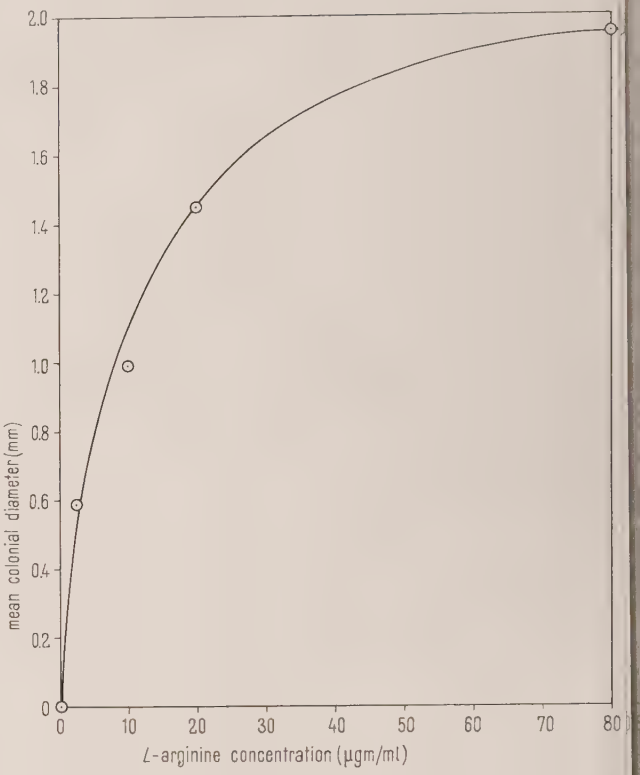


Fig. 1. Growth response of G-12 arg$^-$ on minimal A plates with increasing concentrations of *L*-arginine. Mean colonial diameters are plotted against *L*-arginine concentration. Each point represents the mean of 60–75 measurements made from photographs of the plates.

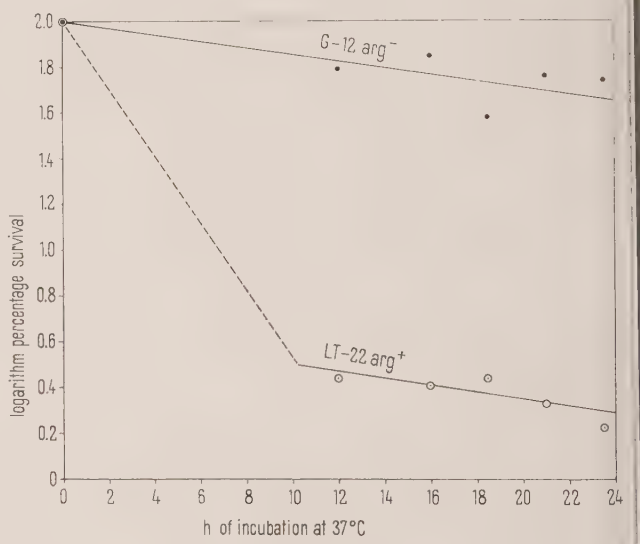


Fig. 2. Differential killing of arg$^-$ and arg$^+$ cells incubated in liquid minimal medium plus 50 i.u. penicillin per ml. Logarithm of percentage survival is plotted against the period of incubation at 37°. Upper line shows survival of the arg$^-$ G-12 cells; lower line that of the prototrophic LT-22 cells.

[7] B. W. Holloway, J. gen. Microbiol. *13*, 572 (1955).
[8] B. D. Davis and E. S. Mingioli, J. Bacteriol. *60*, 17 (1950).
[9] E. M. Witkin, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *21*, 123 (1956).
[10] V. N. Iyer and W. Szybalski, J. appl. Microbiol. *6*, 24 (1958).
[11] U. Leupold, Arch. Jul. Klaus-Stiftung, Zürich *30*, 15. Jahresber. S.S.G. 506 (1955).

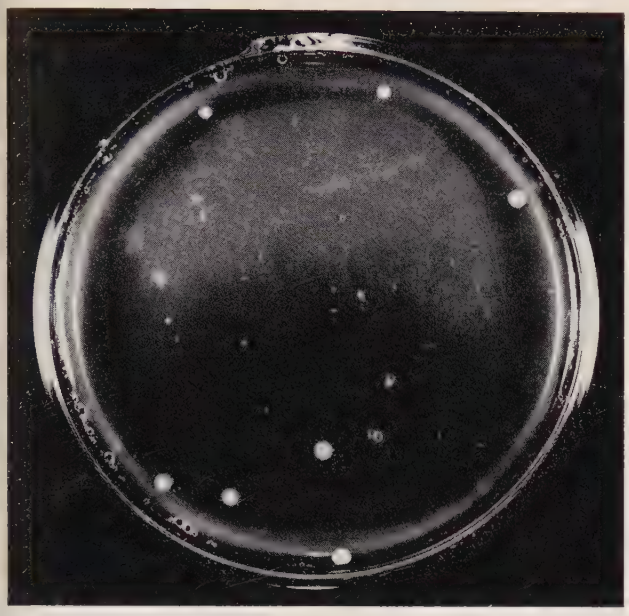


Fig. 3. Arg$^+$ reversions of G-12 induced by UV on minimal A plate with limited broth enrichment.

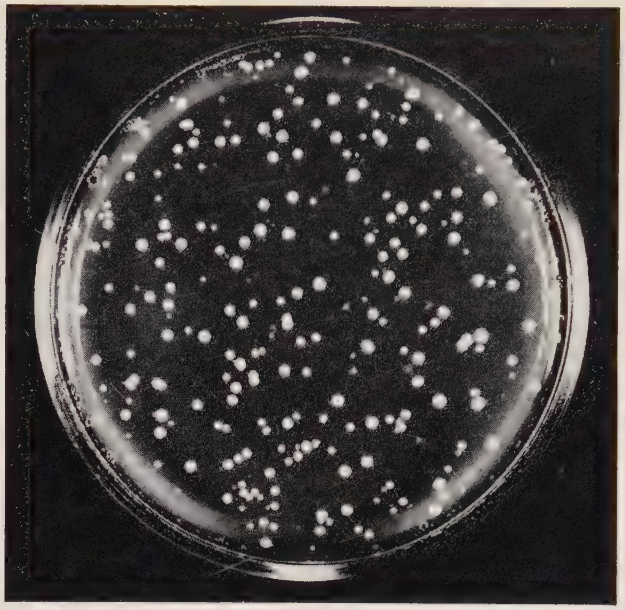


Fig. 4. Reversions of G-12 produced by direct treatment with 0.03 ml of ethyl methane sulphonate on limitedly enriched minimal A medium.

richia coli K-12 strains HfrC and HfrH, with cysteine auxotrophs of *Klebsiella pneumoniae* strains 2 PARK and 8172, and a methionine auxotroph of *K. pneumoniae* strain 418. Strong syntrophism occurred between Salmonella prototrophs and auxotrophs, including G-12, and met$^-$ or cys$^-$ mutants of Escherichia and Klebsiella, probably due to H_2S production by the Salmonellae[12].

Résumé. L'auteur décrit un mutant auxotrophe pour l'arginine chez *Salmonella typhimurium*. Les prototrophes arg$^+$ sont induits par les rayons UV, $MnCl_2$ et méthane sulfonate d'éthyle. Le β-propiolactone est moins efficace pour l'induction des arg$^+$. La transduction avec le bactériophage PLT-22 cultivé sur une souche prototrophe donne arg$^+$ à une fréquence de $1/10^7$ bactériophages. Le mutant arg$^-$ est fécond ni avec les souches d'*Escherichia coli* K-12 HfrC et HfrH ni avec trois souches de *Klebsiella pneumoniae*.

C. H. Clarke[13]

Institute of Animal Genetics, Edinburgh (England), May 19, 1961.

[12] H. H. Plough, H. Y. Miller, and M. E. Berry, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. *37*, 640 (1951).

[13] I am very grateful to Professor D. G. Catcheside, F.R.S., for his invaluable encouragement and advice, and to the Agricultural Research Council for the award of a Research Studentship.

Uptake of C^{14}-Ethionine by Mouse Foetuses[1]

In connection with our investigations on the incorporation of C^{14}-ethionine into the pancreas, surprisingly high accumulation of radioactivity was observed in the foetuses of pregnant mice.

Various investigators have reported that amino acid analogues have specific effects on the growth of the foetus and are toxic for it[2–4]. It has been suggested that this effect is primarily concerned with protein synthesis of the embryonic cell.

The administration of ethionine—the ethyl analogue of methionine—to male or female rats causes acute pancreatic acinar necrosis[5,6]. The pathogenesis of the pancreatic lesions is apparently related to interference in some phase of methionine metabolism since the changes are prevented by the simultaneous administration of methionine.

Ethionine has been given to pregnant rats in an attempt to induce congenital cystic fibrosis of the young pancreas[4]. This attempt failed but many of the young were born dead, had various congenital malformations, or were undersized. Although the maternal pancreases were severely damaged by the ethionine injections, the foetal pancreas remained essentially normal and the authors therefore questioned the passage of the ethionine across the placenta. Against this background, we should like to report our observations on the uptake and nature of the radioactivity observed in the foetuses after administration of C^{14}-ethionine to pregnant mice.

Two days before expected parturition, pregnant albino mice (body weight 30 g) were injected intravenously with 1 μC C^{14}-*DL*-ethionine (Research Specialties, Richmond, Calif., U.S.A., Spec. act. 1.2 mc/m*M*).

[1] This work was supported by grants from the Swedish Medical Research Council.

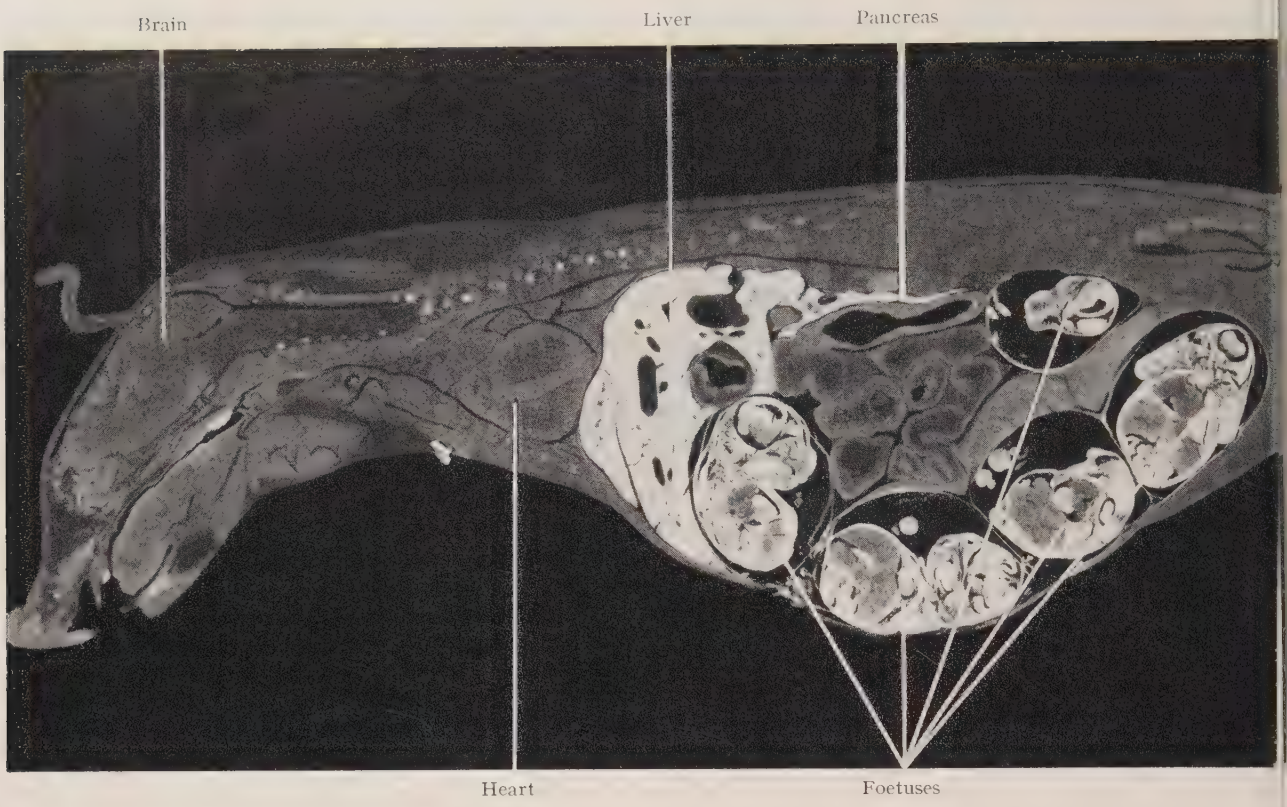
[2] C. M. Lee, B. A. Wiseman, S. A. Kaplan, and J. Warkany, J. Arch. Path. *59*, 232 (1955).

[3] C. A. Waddington and M. J. Perry, J. Embryol. exp. Morph. *6*, 366 (1958).

[4] H. Herrman, V. R. Konigsberg, and M. F. Curry, J. exp. Zool. *128*, 359 (1955).

[5] E. Farber and H. Popper, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *74*, 838 (1958).

[6] R. C. Goldberg, I. L. Chaikoff, and H. Dodge, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *74*, 869 (1950).



Autoradiogram showing distribution of radioactivity in a pregnant mouse 4 h after the intravenous injection of C^{14}-ethionine. The concentration in the foetuses is significantly higher than in any of the maternal tissues, except the liver and pancreas which have a concentration similar to that of the foetuses.

The mice were killed 5, 15, 30 min, 1, 4, 8, and 24 h after injection of ethionine and were subjected to autoradiography[7]. The autoradiographic studies show that ethionine rapidly penetrates the placenta of the mouse and accumulates in the foetus (Figure). High uptake can also be observed in the maternal pancreas and liver.

1 h after injection the concentration in the foetus is of the same magnitude as in the liver of the mother, but after 4 h the concentration in the foetus is greater than that in the mother.

In another series of experiments, the foetuses were removed 15 min and 1, 4, and 24 h after administration of the same amount of C^{14}-ethionine. The foetuses and the liver and pancreas of the mother were homogenized separately in 10% trichloroacetic acid (T.C.A.) and prepared as previously described[8]. Radioactivity of the T.C.A. soluble and of the T.C.A. precipitated and purified protein fraction was measured with a Tri-carb liquid scintillation counter[9].

Radioactivity was found only in the T.C.A. soluble fraction of the foetuses and of the maternal liver and pancreas, and no radioactivity could be observed in the protein fraction of the foetus and in the liver and the pancreas of the mother. The T.C.A. soluble radioactivity in the foetuses varied between 5.4–9.8% of the injected dose.

The experiments were repeated with C^{14}-*DL*-methionine (Amersham, spec. act. 6.6 mc/m*M*) and the results are shown in Table II. In contrast to the results obtained after injection of ethionine, a high incorporation was observed in the proteins of the pancreas, the liver, and the foetuses. For methionine, the radioactivity in the protein fractions (with the exception of the 15 min foetuses sample) was at least 5–10 times greater than in the T.C.A. soluble fraction.

In view of earlier findings on the incorporation of ethionine into animal tissue[10], and in order to find an explanation for the toxic effect on the foetuses, some further experiments were undertaken with higher doses of ethionine (5 μC). In these experiments radioactivity could be observed in the protein fraction but the main part of the radioactivity was found always in the T.C.A. soluble fraction (Table III).

Tab. I. Specific radioactivity in the T.C.A. (10% trichloroacetic acid) soluble fraction and in the protein fraction of foetus and material liver and pancreas after the intravenous injection of pregnant mice with C^{14}-ethionine.

Mouse No.	Time after administration of C^{14}-ethionine	T.C.A. soluble radioactivity Cpm/mg dry weight			Protein bound radioactivity Cpm/mg protein		
		foetus	liver	pancreas	foetus	liver	pancreas
1	15 min	78	58	697	0	0	0
2	1 h	154	30	281	0	0	0
3	4 h	290	120	322	0	0	0
4	24 h	76	56	274	0	0	0

[7] S. ULLBERG, Acta radiol. Suppl. 118 (1954).
[8] E. HANSSON, Acta physiol. scand. Suppl. 161 (1959).
[9] M. VAUGHAN, D. STEINBERG, and J. LOGAN, Science *126*, 446 (1957).
[10] L. LEVINE and H. TARVER, J. biol. Chem. *192*, 835 (1951).

Paper chromatography was performed after hydrolysis[11] of foetal proteins from the ethionine-injected animals and the radioactivity was determined on the chromatograms by means of autoradiography. The radioactivity was detected mainly in the spots corresponding to ethionine and ethionine sulphoxide.

Tab. II. Specific radioactivity in the T.C.A. (10% trichloroacetic acid) soluble fraction and in the protein fraction of foetus and maternal liver and pancreas after the intravenous injection of pregnant mice with C^{14}-methionine

Mouse No.	Time after administration of C^{14}-methionine	T.C.A. soluble radioactivity Cpm/mg tissue dry weight			Protein bound radioactivity Cpm/mg protein		
		foetus	liver	pancreas	foetus	liver	pancreas
5	15 min	27	31	311	40	215	780
6	1 h	32	22	66	165	187	519
7	4 h	26	23	24	329	191	215
8	24 h	55	13	32	144	141	114

Tab. III. Specific radioactivity in the T.C.A. (10% trichloroacetic acid) soluble fraction and in the protein fraction of foetus after the intravenous injection of pregnant mice with C^{14}-ethionine.

Mouse No.	Time after administration of C^{14}-ethionine	T.C.A. soluble radioactivity Cpm/mg tissue dry weight	Protein bound radioactivity Cpm/mg protein
9	15 min	109	8
10	15 min	1983	69
11	1 h	579	20
12	1 h	3045	60
13	4 h	643	20
14	4 h	994	59
15	24 h	4148	34
16	24 h	1163	74

These studies indicate that ethionine may freely pass the placenta barrier of the mouse and accumulate in the foetus. A very small part of the radioactive ethionine is incorporated into the foetal proteins. From this has been assumed that an abnormal protein is formed in which the naturally occurring amino acid has been replaced by the analogue. Such a replacement may in part explain the toxic effect of ethionine on the foetus. Most of the radioactivity, however, is found in the non-protein fraction, and earlier observations[12] have shown that ethionine can furnish ethyl radicals for synthesis of choline and thus produce triethylcholine which has proved to have a growth-inhibiting effect on rats. The present observations therefore support the concept that ethionine may exert its effect on the organism in other ways in addition to the formation of abnormal proteins.

Zusammenfassung. Trächtige Mäuse wurden zwei Tage vor dem erwarteten Werfen mit dem Antimetabolit des Methionins ^{14}C-*DL*-Aethionin intravenös behandelt. Aufnahme und Einbau des Antimetabolits wurden gleichzeitig autoradiographisch und chemisch untersucht. Die Plazentaschranke ist für Aethionin durchlässig; die Radioaktivität fand sich in den Foeten angehäuft, dabei war aber nur ein ganz geringer Teil des Aethionins in den Eiweisskörper derselben eingebaut. Der Einbau des Aethionins in den Organen (Leber und Pankreas) der Mutter war ebenfalls äusserst gering.

Aus den Ergebnissen wird der Mechanismus der toxischen Wirkung des Aethionins erklärt.

E. Hansson and T. Garzo[13]

Department of Pharmacology, Kungl. Veterinärhögskolan, Stockholm (Sweden), June 28, 1961.

[11] D. Gross and H. Tarver, J. biol. Chem. *217*, 169 (1955).
[12] J. A. Stekol and K. Weiss, J. biol. Chem. *185*, 577 (1950).
[13] Present address: Chemical Institute of the Medical University, Budapest (Hungary).

Mechanism of the Serotonin Depressor Response Following BAS-Phenol Administration in the Dog

The number of serotonin (5-hydroxytryptamine) antagonists which have been tested in both isolated tissues and intact animals is legion, but only a select few have been shown to be active against the cardiovascular effects of serotonin. The benzyl analog of serotonin, 1-benzyl-2-methyl-5-methoxytryptamine or BAS, is one of the more potent antagonists and it has been found to be effective against the pressor action of serotonin in the dog[1]. An even more powerful serotonin antagonist has been synthesized from BAS by cleavage of the methyl ether to form 1-benzyl-2-methyl-5-hydroxytryptamine or BAS-phenol[2]. In anesthetized dogs, intravenous injection of BAS-phenol blocks the pressor response to serotonin selectively while the pressor action of tryptamine remains unaffected, or may even be potentiated[3]. Possibly as a result of blockade of the pressor component of serotonin action, augmentation of the depressor phase in its activity occurs. The following studies were undertaken to investigate the mechanism of the depressor response to serotonin which is unmasked by the administration of BAS-phenol in the anesthetized dog.

Experiments were performed on 14 mongrel dogs of both sexes, weighing from 8 to 18 kg. The dogs were anesthetized with sodium pentobarbital[4], 30 mg/kg, administered intravenously. Arterial blood pressure was recorded with a mercury manometer from a femoral artery. Drug injections were made into the cannulated ipsilateral femoral vein. The agonist drugs and corresponding doses used were serotonin creatinine sulfate, 10–120 μg/kg, tryptamine hydrochloride, 125–500 μg/kg, histamine phosphate, 3–5 μg/kg, and acetylcholine bromide, 5–10 μg/kg. The antagonist drugs used were 1-benzyl-2-methyl-5-hydroxytryptamine hydrochloride (BAS-phenol)[5], 2.5 mg/kg, and diphenhydramine hydrochloride[6], 5 mg/kg. Doses for the agonist drugs are expressed in terms of the base while those for the antagonists are in terms of the salt.

[1] E. Shaw and D. W. Woolley, J. Pharmacol. *116*, 217 (1956).
[2] E. Shaw and D. W. Woolley, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *96*, 439 (1957).
[3] D. W. Woolley and E. Shaw, J. Pharmacol. *121*, 13 (1957).
[4] Trade name Nembutal.
[5] Generously supplied by Dr. K. Pfister, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, N. J.
[6] Trade name Benadryl.

In all the dogs tested, where the response to serotonin was initially pressor, after the administration of BAS-phenol the arterial pressure response to serotonin became purely depressor. As compared with the control responses, the serotonin depressor response elicited after BAS-phenol administration was greater in degree and duration. This depressor response to serotonin can be blocked with diphenhydramine, an antihistaminic drug. To test specificity of the blockade, control injections of acetylcholine were given before and after administration of diphenhydramine. Figure 1 shows the results obtained from such an experiment. Blockade of depressor responses to serotonin and histamine is attained with diphenhydramine in doses which do not have any significant effect on similar responses to acetylcholine. The tracing also shows that section of both vagi nerves at the cervical level to eliminate the Bezold reflex, does not alter the depressor responses to serotonin, histamine or acetylcholine.

Following the administration of various serotonin antimetabolites, including BAS, SHAW and WOOLLEY consistently observed that 'the initial fall in pressure after serotonin injection was both large and persistent', however, no attempt was made at elucidation of the mechanism involved in this depressor response[7]. The effect of single injections of serotonin on canine blood pressure usually consists of three phases: an initial fall with concurrent slowing of the heart rate, followed by a rise and then finally by a prolonged fall in pressure[8]. The initial fall has been ascribed to a Bezold-like reflex since it can be abolished by either vagotomy or atropinization[9], while the final fall is believed to be due to other mechanisms. The release of endogenous histamine as a mechanism to explain the sustained fall in pressure produced by serotonin in anesthetized dogs, has previously been demonstrable only when serotonin is given by continuous infusion[10]. Antihistaminic drugs have been reported to have no effect on the late depressor phase of the response to single

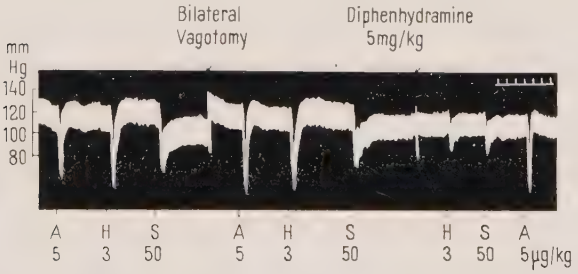


Fig. 1. Blockade by diphenhydramine of depressor responses to serotonin following BAS-phenol administration. Femoral blood pressure in a dog, 8.6 kg, under pentobarbital anesthesia. BAS-phenol, 2.5 mg/kg, was given i.v. prior to recording of responses. H, histamine, A, acetylcholine, and S, serotonin. Note the absence of effect of bilateral cervical vagotomy on the responses to the agonist drugs. Time interval: 1 min.

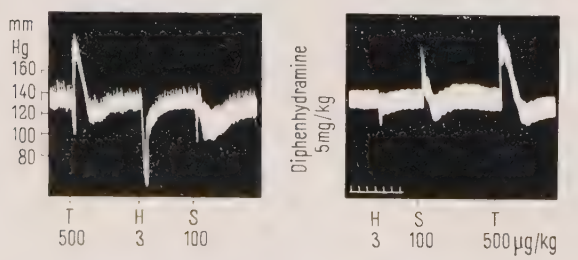


Fig. 2. The effect of diphenhydramine on arterial pressure responses to serotonin, histamine and tryptamine. Dog, 12 kg, under pentobarbital anesthesia. T, tryptamine, H, histamine, and S, serotonin. Time interval: 1 min.

injections of serotonin and histamine release as a possible mechanism in this situation was therefore discarded[11]. The present findings however indicate that if the dog is protected from the other cardiovascular effects of serotonin, a histamine mediated mechanism can be shown even with single injections of serotonin. Serotonin is known to release endogenous histamine from living tissues[12] and this mechanism has been shown to be responsible for the depressor response elicited by serotonin in the chicken[13–15].

It has been reported that various antihistaminic drugs, including diphenhydramine, reduce the pressor response to serotonin in dogs[16]. Although the predominant effect of serotonin in the dog is usually a rise in arterial pressure, occasionally the response is markedly depressor to begin with. The results obtained in our laboratory from an animal in which the initial response to serotonin is depressor, is shown in Figure 2. Our results indicate that diphenhydramine, given in a dose sufficient for antihistaminic blockade, augments the pressor component and diminishes the depressor phases of serotonin action. The present data might possibly be explained as an augmentation of the pressor component due to the absence of opposition from the histamine which is released since a block has been established at the histamine receptor sites.

The complex cardiovascular situation occurring after serotonin injection as affected by BAS-phenol may well be analogous to the well documented reversal of epinephrine effects on blood pressure brought about by adrenergic blocking agents. Intravenous injections of epinephrine produce a rise in blood pressure but when the same injections are given after adrenergic blockade has been established, epinephrine produces a fall in pressure. In a similar fashion, upon injection of serotonin, the cardiovascular effects manifested actually represent an interplay of several mechanisms, some which would elevate blood pressure and others which would produce a fall. The latter are usually obscured by the stronger pressor activity in the untreated anesthetized dog and can be unmasked only when such pressor actions have been prevented by suitable blocking agents.

Résumé. Après l'administration de BAS-phénol à des chiens anesthésiés, l'effet usuel de la sérotonine d'augmenter la pression artérielle se convertit constamment en un abaissement prolongé de la pression. Cet effet d'abaissement n'est pas influencé par la section bilatérale des deux nerfs vagues, mais on peut le bloquer avec la diphénhydramine. Les données présentées suggèrent que la réponse d'abaissement de la pression artérielle de la sérotonine qui survient dans les chiens ayant été traités avec du BAS-phénol est dûe à une libération d'histamine endogène.

R. D. BUÑAG and E. J. WALASZEK

Department of Pharmacology, University of Kansas Medical Center, Kansas City (Kansas), July 10, 1961.

[7] E. SHAW and D. W. WOOLLEY, J. Pharmacol. *116*, 217 (1956).
[8] I. H. PAGE, in *5-Hydroxytryptamine* (Ed. by G. P. LEWIS, Pergamon, New York 1957).
[9] I. H. PAGE, J. Pharmacol. *105*, 58 (1952).
[10] I. H. PAGE and J. W. MCCUBBIN, Amer. J. Physiol. *184*, 265 (1956).
[11] G. REID, J. Physiol. *118*, 435 (1952).
[12] F. FELDBERG and A. N. SMITH, Brit. J. Pharmacol. *8*, 406 (1953).
[13] R. D. BUÑAG and E. J. WALASZEK, Fed. Proc. *20*, 11 (1961).
[14] R. D. BUÑAG and E. J. WALASZEK, J. Pharmacol. *133*, 52 (1961).
[15] R. D. BUÑAG and E. J. WALASZEK, Arch. int. Pharmacodyn., in press.
[16] I. H. PAGE and J. W. MCCUBBIN, Amer. J. Physiol. *174*, 439 (1953).

Endomeiosis and Sex Determination in *Daphnia pulex*

Environmental factors that favour the appearance of amphigonic individual ins parthenogenetically reproducing populations are supposed to exert their influence upon female individuals that, although they are phenotypically homogeneous, are nevertheless endowed with sexually differentiated genotypes[1]. It has also recently been shown that a modified type of true meiosis—which has been named endomeiosis—takes place during the maturation of parthenogenetic eggs of Aphids and gives rise to genetic variability within parthenogenetic lines[2].

This investigation was started in order to establish whether endomeiosis takes place also during the maturation of parthenogenetic eggs of Daphnids, where Weismann established that a single polar body is formed and the diploid number of chromosomes is preserved[3]. More recent research seemed to confirm the absence of meiosis in the parthenogenetic lines of *Daphnia pulex*[4], which are therefore thought to form clones.

The attached Figures 1–4 have been taken from very young oocytes of *Daphnia pulex* from Emily which appears to belong to a tetraploid race, the diploid number being 8[5]. Figure 1 shows an oocyte at pachytene stage where pairing appears evident in the formation of bivalents. Figure 2 shows an advanced diplotene stage where the bivalents, which appear near the periphery of the nucleus, are rather contracted. Eight bivalents are present in the nucleus although the photograph shows only six of them. The next photograph (Figure 3) shows various stages of the deconjugation[6] or disjunction of the bivalents corresponding to the first anaphase, which is taking place within the nuclear membrane. Figure 4 shows the product of these pairing and deconjugation processes corresponding to the first maturation division. These, however, result in the restoration of the somatic number of chromosomes because the products of the division of the bivalents remain within the nuclear membrane and no polar body is formed as a result of this division. Only twelve such chromosomes—instead of sixteen—are visible in the Figure. The subsequent division – which has been described by various authors[7]—corresponds, therefore, to the second maturation division and the single polar body which is formed subsequently corresponds to the second polar body, as already demonstrated in the case of Aphids.

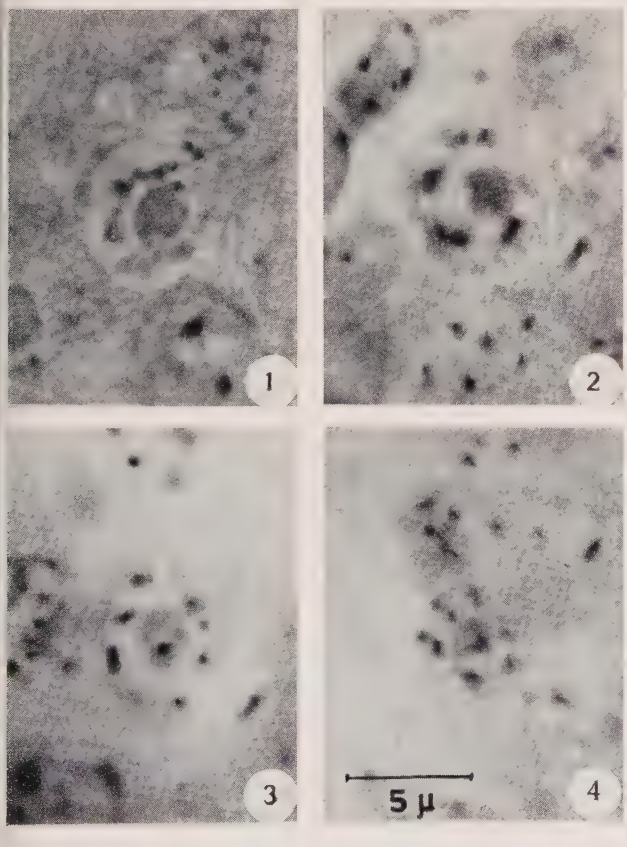


Fig. 1. Pachytene stage in the maturation of the parthenogenetic eggs of *Daphnia pulex*. Fig. 2. Late diplotene stage. Fig. 3. 'Deconjugation' or disjunction of the bivalents. Fig. 4. Chromosomes resulting from pairing and deconjugation.

Thus parthenogenesis is of meiotic type in the Emilian race of *Daphnia pulex* and it can safely be assumed that recombination can give rise to genetic variability within single parthenogenetic lines of *Daphnia*, as has been genetically demonstrated in parthenogenetic lines of Aphids. This explains why Banta and Wood[8] found that variability in theligenous parthenogenesis of Daphnids is as high as in the offspring of amphigonic reproduction.

Previous experimental research has shown that male individuals can be induced in parthenogenetic lines of *Daphnia pulex* and of several other species of Daphnids[9] by a number of environmental factors. As meiotic parthenogenesis was unknown in Daphnids, the appearance of amphigonic individuals from such parthenogenetic lines was thought to be exclusively due to external factors, that is to be entirely phenotypical[10].

The discovery of endomeiosis in *Daphnia pulex* shows the possibility of obtaining different sex genotypes through recombination within parthenogenetic lines of Daphnids and consequently the possibility of a not purely phenotypic sex determination. Previous observations can also be explained by the presence of endomeiosis. It has been reported[11] that strains which were able to produce amphigonic individuals under given environmental conditions were no longer able to do so under the same conditions after a long period of parthenogenetic reproduction. It can now be suggested that, during the endomeiotic processes, predominantly male genotypes have been segregated and have been eliminated while under the laboratory conditions that selected in favour of parthenogenetic reproduction. The sex variability of the original strains has apparently been reduced through an elimination of male factors and a race showing acyclical parthenogenesis has been evolved.

Environmental factors thus appear to have in Daphnids both a direct influence upon the differentiation of the sex phenotypes and a selective influence upon the different genotypes available within parthenogenetic lines. The latter was indeed postulated in pioneer work by Weismann[12].

[1] G. Bacci, Rend. Acc. Naz. Lincei *23* (*8*), 165 (1957).
[2] G. Cognetti, Exper. *17*, 168 (1961).
[3] A. Weismann, Zool. Anz. *9*, 570 (1886).
[4] C. H. Mortimer, Zool. Jahrb. (Abt. Phys.) *56*, 323 (1936).
[5] F. Schrader, Z. ind. Abstamm.- VererbLehre *40*, 1 (1925).
[6] W. von Baehr, La Cellule *30*, 317 (1920).
[7] A. Kühn, Arch. Zellforsch. *1*, 538 (1908).
[8] A. M. Banta and T. Wood, Verhandl. V. Int. Congr. Vererbungswiss. (1927).
[9] A. M. Banta and L. A. Brown, Phys. Zool. *5*, 218 (1932). – M. von Dehn, Zool. Jahrb. (Abt. Phys.) *65*, 334 (1955).
[10] M. Hartmann, *Die Sexualität*, 2. Aufl. (Jena 1956).
[11] A. M. Banta, Science *41*, 442 (1915).
[12] A. Weismann, *Beiträge zur Naturgeschichte der Daphniden* (Leipzig 1876–79).

Riassunto. È descritto un processo endomeiotico in *Daphnia pulex* dove la maturazione delle uova partenogenetiche veniva finora ritenuta di tipo ameiotico. L'endomeiosi e la conseguente possibilità di ricombinazione genetica mostrano la possibilità di comparsa di genotipi sessuali multipli e spiegano la riduzione della variabilità sessuale in allevamenti di Dafnidi riprodottisi partenogeneticamente per molte generazioni.

G. BACCI, G. COGNETTI, and A. M. VACCARI

Istituto di Zoologia dell'Università di Modena (Italy), July 28, 1961.

Extraction et isolement d'une hormone placentaire à effet inhibiteur sur l'utérus[1]

Le liquide amniotique prélevé sur des grossesses humaines jeunes et intactes a un pouvoir inhibiteur sur la motilité utérine de la rate, du cobaye et de la lapine. Son effet consiste dans un abaissement du tonus et dans une diminution de la fréquence et de l'amplitude des contractions spontanées de l'utérus[2-4]. Cette action pharmacologique particulière du liquide amniotique, confirmée récemment par CUPARENCU[5] a pu être reproduite sur l'utérus *in situ* de la rate et de la lapine[6-8] et sur l'utérus *in situ* de la rate portante[9]. Outre l'inhibition utérine, le liquide amniotique provoque également une hypérémie de l'utérus et des ovaires de la rate. L'origine placentaire du facteur inhibiteur et du facteur provoquant l'hypérémie des ovaires a pu être démontrée par leur production *in vitro* dans des cultures de cellules choriales[10]. Des travaux récents ont abouti à l'extraction et l'isolement de l'hormone en question de l'urine de femmes enceintes. La présente communication donne une description sommaire du procédé utilisé et des résultats obtenus. Pour simplifier, le facteur inhibiteur et d'hypérémie est désigné par les lettres P.P.F. (Pregnancy Protecting Factor).

(1) *Méthode d'extraction.* La préparation schématisée dans le Tableau I consiste à extraire la dite substance par précipitations répétées en milieu acide avec un solvant organique, de soumettre les précipités à des dialyses prolongées et de séparer les protéines insolubles et inactives par centrifugation. On obtient ainsi un produit purifié (U 11) titrant 1200–3400 Unités-Rat par mg de substance sèche.

(2) *Méthode d'isolement.* L'extrait U 11 est ensuite séparé en une fraction protéique inactive et en un péptide glycidique biologiquement actif. Cette séparation se fait avec le procédé suivant: On dissout 6 mg de l'extrait U 11 dans 0,3 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1%. Le mélange est déposé sur une ligne droite longue de 30 cm située à 5 cm de distance du bord d'un papier filtre Whatman No. 2 (dimensions 35 × 35 cm). Chromatographie ascendante dans un solvant éthanol à 50% à la température de 4° pendant 16 h. Après que le papier ait été séché à la température ambiante, on découpe la zone de papier comprise entre les valeurs Rf 0,11–0,38 et on l'élue en chambre humide à 4° avec de l'eau distillée. L'éluat est lyophilisé, puis déminéralisé par ultra-filtration sous pression de 8 atmosphères d'un mélange gazeux composé de 95% d'oxygène et de 5% d'anhydre carbonique.

(3) *Résultats biologiques.* Le procédé indiqué fournit une substance sèche contenant par mg 25000–50000 U. Rate. 0,05 γ/ml de cet extrait produisent une inhibition de la motilité spontanée de l'utérus isolé de la rate en proœstrus. 0,01–0,025 γ de la dite substance injectée par voie intrapéritonéale à des rats femelles d'un poids de 35–45 g provoquent une hypérémie des ovaires qui se reconnaît à une coloration rouge intense et persistante des ovaires 16 h après l'injection.

(4) *Propriétés physiques et chimiques de l'hormone isolée.* La substance isolée est très soluble dans l'eau. Elle n'est pas précipitée par l'éthanol ou l'acétone à 50%. En solution alcoolique 15–20% de l'activité biologique traverse des ultracellfiltres «feinst» (Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen). La substance est instable dans l'eau distillée à la température ambiante et perd 80% de son activité biologique dans les 6 h. Conservée à 4° sous forme

Tab. I. Méthode d'extraction du P.P.F.

	Conditions de température
1000 ml urine congelée	– 15°
décongelée, filtrée par laine de verre	4°
+ HCl conc. –pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 1/227	
précipité = U 2/227	
+ 50 ml H_2O dist.	4°
+ HCl conc. pH 3,3	
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	
surnageant = U 3/227	
précipité = U 4/227	
+ 75 ml H_2O dist.	4°
dialyse 120 h contre	4°
2000 H_2O dist. échangé	
toutes les 6 h	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 5/227	sédiment = U 6/227
+ HCl conc. pH 3,3	4°
+ 4 Vol. acétone puriss.	– 15°
centrifuger	– 15°
surnageant = U 7/227	
précipité = U 8/227	
sécher 60 min	– 15°
+ 20 ml H_2O dist.	4°
dialyse 16 h contre	
2000 H_2O dist.	
dialysat centrifuger	
surnageant = U 9/227	sédiment = U 10/227 4°
Lyophilisation = *résidu sec* = U 11/227	

[1] Ce travail a été bénéficié de l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique.

[2] O. STAMM, *Avortements tardifs et accouchements prématurés* (Masson & Cie., Paris 1959).
[3] O. STAMM et H. DE WATTEVILLE, Gyn. et Obstr. 53, 171 (1954).
[4] O. STAMM, Arch. Gynäk. *182*, 663 (1953).
[5] B. CUPARENCU, Zentralbl. Gynäk. *82*, 192 (1960).
[6] O. STAMM, Arch. Gynäk. *184*, 761 (1954).
[7] O. STAMM, Gynaecologia (Basel) *136*, 377 (1953).
[8] O. STAMM, Gynaecologia (Basel) *135*, 125 (1953).
[9] D. DESSARZIN, Thèse No. 2741, Université de Genève.
[10] O. STAMM et M. PACCAUD, Arch. Gynaek., sous-presse.

lyophilisée, l'activité se maintient pendant au moins 2 mois. Le résultat de l'analyse élémentaire et du dosage des hexoses et hexosamines est résumé dans le Tableau II. A l'encontre de l'hormone placentaire protéique (gonadotrophine choriale) isolée récemment par Bourillon et Got[11], le P.P.F. se distingue par un pourcentage en azote nettement plus faible (6,52% à la place de 10,5% trouvé par Got) et un taux en substances glucidiques plus élevé (41% à la place de 19,7%, Got). L'analyse qualitative des acides aminés par chromatographie après hydrolyse en tube scellé révèle la présence d'au moins 7–10 acides aminés.

Tab. II. Caractères analytiques du P.P.F. (facteur inhibiteur et hyperémie)

Activité biologique (unités rate/mg)	25000–50000
N (%)	6,52
C (%)	46,68
H (%)	7,3
Hexoses (%)	26,0
Hexosamines (%)	15,0
Acides aminés, approximativement	7–10

Nous en concluons que le P.P.F. (facteur d'inhibition utérine et d'hyperémie ovarique) est, dans sa forme actuelle, un complexe formé d'acides aminés et de sucres avec un poids moléculaire relativement peu élevé.

Summary. Description of a process for extraction and isolation of a placental hormone with the following biological and chemical properties: (1) Inhibition of the spontaneous contractions of the isolated rat-uterus with 0.05 γ/ml. (2) An ovarian hyperaemia reaction is produced by intraperitoneal injection of 0.01–0.025 γ to rats weighing between 35 and 45 g. (3) The biologically active product is of comparatively low molecular weight. Analytical research suggests as principal constituents amino-acids and sugars.

O. Stamm

Clinique universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique, Genève, Centre de transfusion et Laboratoire central de l'Hôpital cantonal, Genève (Suisse), le 15 mai 1961.

[11] R. Bourillon, R. Got et R. Marcy, Bull. Soc. Chim. biol. *41*, 267 (1959).

Drosophila Tumors and the Structure of Larval Lymph Glands

Hereditary *Drosophila* tumors are usually melanotic formations which arise in the larvae through an aggregation and subsequent melanization of lymph cells. During the larval or pupal stage, the cellular character of these formations disappears, and the adults show only easily detectable pigment masses. Phenocopies of these tumors can be induced by several substances[1,2]. As shown in former experiments[3–5], they also can be induced very frequentily (about 70%) by injecting acellular larval extracts of tumorous (*tu*^{g}, se e^{11} *tu*^{49h}) and tumorless (e^{11}) stocks of *D. melanogaster* into larvae of the tumorless *yw* stock.

The same extracts failed to induce such phenocopies in Berlin wild stock; this means that a host specificity exists for the induction of melanotic formations in *Drosophila*. In *yw* even an injection of physiological solution succeeded in inducing a small but significant number (18.4%) of melanotic tumors, demonstrating how easy it is to induce such formations in this stock. The production of these formations is probably caused by a defence reaction of the insect, as was also shown by Walker[6] in investigations with the parasite *Pseudocoila bochei*.

The problem is to show what structure or what kind of mechanism is responsible for the different reactions of *yw* and Berlin wild to the injection of acellular extracts. The present paper deals with the first part of a series of different investigations aimed at clarifying this problem.

The structure of the lymph gland of *Drosophila* larvae has been described by several authors[7,8]. This gland is situated near the dorsal vessel and consists of pairs of lobes on both sides of this vessel. As seen in Figure a, the first two pairs of lobes are usually bigger than the other pairs. Because the lymph gland produces the lymph cells, it is also often called the blood-forming organ. As reported by some investigators[9–12], the structure of the lymph gland is generally more intact in tumorless than in tumorous stocks, even though also tumorless stocks can have very loose lymph glands. On the other hand, the authors found no tumorous stock with completely intact lymph glands. Therefore, a loose character of the lymph gland seems to be necessary for producing tumors in *Drosophila*, although it is undoubtedly not the only prerequisite for their formation.

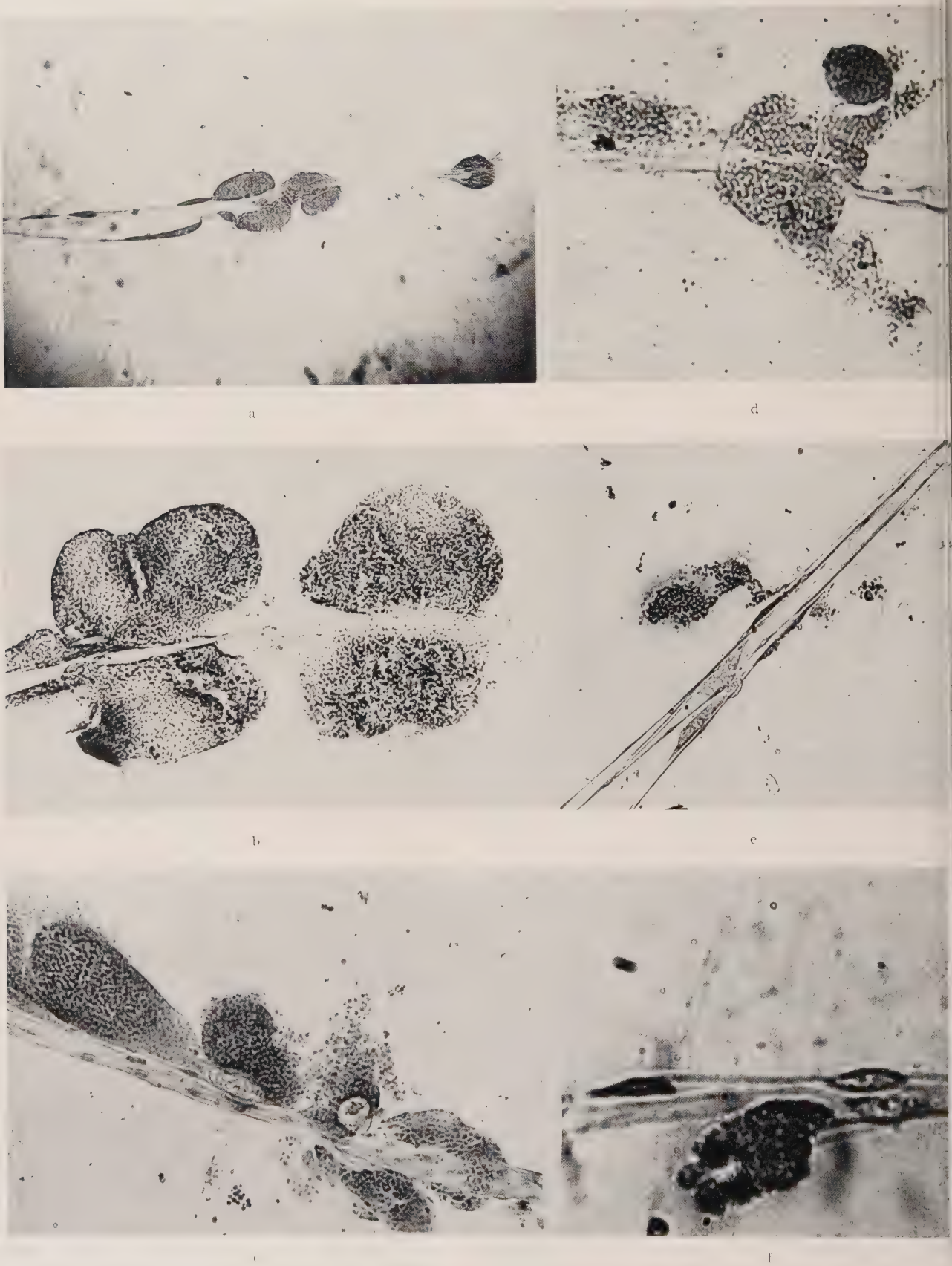
In the present investigation, I examined lymph glands of the following tumorless and tumorous stocks which I used in the induction experiments: *yw*, Berlin wild (hosts), *tu*^{g}, se e^{11} *tu*^{49h}, e^{11} (donors). To prevent the age of the larvae and environmental factors from influencing the structure of the lymph glands in a different manner, the

Lymph gland structure and tumor penetrance.

Stocks[a]	% tumor incidence
Berlin wild	0
e^{11}	0
yw	0
tu^g	± 70
se e^{11} *tu*^{49h}	± 60

[a] The column is arranged so as to classify the lymph gland structure from the compact (top) to the very loose (bottom). Differences are slight between e^{11} and *yw*, and between *tu*^{g} and se e^{11} *tu*^{49h}; greater between Berlin wild and e^{11}, and between *yw* and *tu*^{g}.

[1] M. C. Castiglioni and S. Beati, Exper. *10*, 501 (1954).
[2] M. C. Castiglioni, Atti II Riunione A.G.I., La Ricerca Scientifica, Suppl. *26*, 125 (1957).
[3] G. Röhrborn, Diplomarbeit, Humboldt-Universität, Berlin (1955).
[4] G. Röhrborn, Dros. Inf. Serv. *30*, 148 (1956).
[5] G. Röhrborn, Arch. Entw. mech. Org. *150*, 115 (1957).
[6] I. Walker, Rev. Suisse Zool. *66*, 569 (1959).
[7] M. B. Stark and A. K. Marshall, J. Amer. Inst. Homeopathy *23*, 1204 (1930).
[8] H. H. El Shatoury, Arch. Entw. mech. Org. *147*, 489 (1955).
[9] C. Barigozzi, J. cell. comp. Physiol. *52*, 371 (1958).
[10] C. Barigozzi, M. C. Castiglioni, and A. Di Pasquale, Exper. *14*, 443 (1958).
[11] C. Barigozzi, M. C. Castiglioni, and A. Di Pasquale, Heredity *14*, 151 (1960).
[12] C. Barigozzi, M. C. Castiglioni, and A. Di Pasquale, ACTA *16*, 53 (1960).



(a) Ring gland (r) and total lymph gland of Berlin wild (× 44); (b)–(f) lymph glands of Berlin wild (b), e^{11} (c), *yw* (d), *tu*ε (e), and se e^{11} tu^{49h} (f) (× 125).

lymph glands of 120 h old larvae (referring to the time of egg laying) had been investigated under the same culture conditions. According to Barigozzi, Castiglioni, and di Pasquale[11], the lymph glands of non-etherized larvae were dissected in physiological solution, embedded in agar, fixed in Carnoy's fluid and mounted in euparal. Of every stock more than thirty lymph glands had been investigated.

The lymph glands of Berlin wild larvae proved to be intact; less intact seem to be the lymph glands of e^{11} and *yw*, while the least intact are those of tu^{g} and se e^{11} tu^{49h}. Apparently they release groups of cells into the hemolymph. The dissolution of the lymph glands increases as seen in the Table.

The Berlin wild, e^{11}, and *yw* stocks are genetically tumorless stocks as seen by dissection of 5000 adults[5] and recent investigating of more than 200 third-instar-larvae of every stock. The incidence of hereditary tumors is about 70% in tu^{g} and 60% in se e^{11} tu^{49h}. The morphological structures of some characteristic types of the investigated lymph glands are shown in the Figure.

The results show a difference in the state of the lymph glands between the Berlin wild and *yw* stocks. Since all the tested tumor stocks have loose lymph glands, the loose structure of the lymph glands may be one of the reasons for the reported host specificity, which explains why one can induce tumors more successfully by injecting cellfree extracts in *yw* than in the Berlin wild stock which has intact glands. Certainly it may be not the only reason for this effect. Other experiments are now under way to clarify the host specificity reported above[13].

Zusammenfassung. Die larvalen Lymphdrüsen von 3 tumorfreien und 2 erblich tumorösen Stämmen von *Drosophila melanogaster* wurden untersucht, um Zusammenhänge zwischen dem Auftreten erblicher und durch Injektion zellfreier Extrakte induzierter melanotischer Bildungen zu prüfen. Es wurde gefunden, dass die Lymphdrüsen der getesteten erblich tumorösen Stämme stärkere Auflösungserscheinungen zeigen als die der tumorfreien Teststämme. Die im Vergleich zu Berlin wild lockerere Struktur der Lymphdrüsen von *yw* wird als mitverantwortlich für die bei den Versuchen zur Induktion melanotischer Bildungen in *yw* (positiv) und Berlin wild (negativ) beobachtete Wirtsspezifität angesehen.

G. Röhrborn

Institut für Genetik der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem (Germany), June 14, 1961.

[13] The author wants to express his gratitude to the 'Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma', for a grant, which permitted him to carry out this investigation in the Department of Genetics of the University of Milan, to Prof. C. Barigozzi for his kind hospitality, and to Prof. M. C. Castiglioni for her technical advice.

The *in vitro* Effect of Various Enzymes upon the Mouse Ascites Tumor of Ehrlich[1]

In previous experiments it was noted that the malignancy of ascites tumor cells decreased appreciably after incubation with α-amylase[2]. Additional studies concerning the effect of other enzymes on the malignancy of the ascites tumor cells were therefore undertaken.

Ascites tumor cells (Ehrlich) were harvested from tumor bearing, white Swiss mice (20–22 g) 7 days after inoculation. These cells were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, then washed twice with normal saline equal in volume to the packed cells. The cells were then suspended in twice their volume of saline, the enzyme under investigation was added, and the mixture was incubated at 37° in a water bath equipped with a shaker (90 motions/min). In each experiment a control mixture was incubated without enzyme.

After 9 h incubation, aliquots from each mixture were used for cell counts in a hemocytometer, for eosin resistance tests according to the method of Schreck[3], for the preparation of cell smears, and for the injection of 10 normal mice in order to ascertain their ability to produce tumors. According to the cell counts per unit volume of each mixture, 8.5×10^6 cells were used for each injection. This number was considerably in excess of that needed for the passage of tumor cells (1×10^6) cells. The mice were inspected every 3 days for tumor development and were finally autopsied.

The pH of the tumor cell suspension varied from 7.2 to 7.4, and did not change during incubation more than 0.2 units. Although this is not the optimal pH for some of the enzymes which were investigated, it was decided not to add buffers and alter the pH, in order to avoid introduction of another variable. Moreover, the amount of enzyme used was as a rule quite large. All the enzyme preparations used were purchased from Worthington Biochemical Corporation (New Jersey).

Cell counts, carried out on the cell suspensions at the beginning and end of the incubation, showed no appreciable change in number of cells.

In the following tabulation, the results of various enzymes on the malignancy of the mouse ascites tumor cells are summarized:

(1) Enzymes which did not show any effect upon the malignancy of the tumor cells -i.e., both experimental and control groups had similar survival curves, with 100% accumulated deaths after 16–22 days (Table I).

(2) Enzymes which caused a loss of virulence of the mouse ascites tumor cells—i.e., no evidence of tumor 40 days after inoculation of the experimental group but 100% mortality in control animals (Table II).

Cytological studies were carried out on the various tumor cell preparations.

(a) Eosin-resistance of enzyme-treated cells is shown in Table III.

(b) Duplicate cell smears from mixtures treated by the enzymes in Group 2 were stained by the Papanicolaou method, and with haematoxylin and eosin. They were

Tab. I

Elastase	10[a]	Cathepsin	50	Lysosyme	25
Catalase	50	Carboxypeptidase	10	Collagenase	20
Peroxidase	10	Lipoxydase	25	β-Amylase	30
Lipase	50	Hyaluronidase	25	Trypsin	25

[a] mg/3 cm³ of saline cell suspension, containing about 34×10^7 cells, 3 experiments.

[1] This work was supported in part by a grant from the American Cancer Society (Mass. Division) and in part by grants (C-3538 and CY-4018) from the U.S. Public Health Service, National Cancer Institute.

[2] F. Steckerl, A. Ofodile, R. R. Campbell, and G. H. Friedell, Nature, in press (1961).

[3] R. Schrek, Amer. J. Cancer *28*, 389 (1936).

examined without knowledge as to treatment previously given the incubation mixture. Depending on the appearance of their nuclei, cells were considered to be either viable or non-viable and were tabulated in these two categories. About 25% of the cells of the control preparations were considered to have remained viable at 9 h. After a similar period of incubation with ribonuclease, 50% appeared viable, 80% when chymotrypsin was used, 75% when glucuronidase was used, and approximately 10% when cellulase and arginase were used. In the above experiments, despite the fact that ribonuclease, chymotrypsin and β-glucuronidase markedly altered the malignancy of tumor cells *in vivo*, cytologically more cells appeared viable after *in vitro* incubation than in the control preparations.

Apparently only during starvation and ageing do ascites tumor cells become permeable to the enzyme-proteins. Therefore, the failure of enzymes in Group 1 to affect the tumor virulence need not indicate that the structures, which may be hydrolysed by these enzymes, are non-essential parts of the tumor cells or even absent. The ineffectiveness may be due to permeability barriers on the cell surface, lack of access to the structures in intracellular compartments, or the presence of inhibitors. The interesting difference between the effect of chymotrypsin and trypsin can probably be thus explained, since from a purely enzymatic point of view, these two enzymes do not seem to differ as much as their specificities as was originally thought[4].

Tab. II

Chymotrypsin	25[a]	Arginase	50
Ribonuclease	50	Cellulase	50
β-Glucuronidase	50		

[a] mg/3 cm^3 of tumor cell suspension, containing about 34×10^7, 6 experiments.

Tab. III

Group	h of Incubation	% Eosin-resistant cells
Control	0	85–95
Control	7	80
Enzymes in Group 1	7	70–75
Enzymes in Group 2	7	
Chymotrypsin		50
Ribonuclease		5
Arginase		75
Cellulase		10
Glucuronidase		60

The arginase, β-glucuronidase and cellulase were not pure preparations, and consequently, their effect might possibly have been due to the enzymatic activity of contaminating proteins. In experiments not reported here, we found no evidence of the presence of cellulose in these tumor cells. However, the findings with chymotrypsin and ribonuclease, which are pure preparations, like the results from our previous studies with α-amylase, indicate that a damage to a variety of cellular structures may be quite deleterious to the growth potential of these tumor cells.

Cytological studies, as indicated above, show that inactivation of specific cellular structures to a degree sufficient to prevent the growth of injected tumor cells may not be adequately reflected either by study of fixed and stained preparations or of non-fixed eosin stained preparations. When cell damage was apparent, one could not differentiate specific injury from non-specific.

Moreover, there was a marked discrepancy between the number of presumably viable cells on the basis of the viability criteria of eosin resistance and the number of presumably viable cells on the basis of the microscopical appearance of the cell nuclei. We apparently lack good morphological criteria by which to decide whether or not a cell is capable of multiplication. It has been observed that cells which showed profound changes in their microscopical appearance, may recover completely[5]. On the other hand, cells damaged by a certain amount of radiation may still pass through one or more divisions, although they have lost the power of indefinite proliferation[6]. Thus, it would be hazardous to explain the above findings concerning cell damage through enzyme action by the ratio of presumably viable to presumably non-viable cells. The morphological criteria of viability are apparently not fine enough to ascertain the character as well as the reversibility of cell damage.

Zusammenfassung. Die Virulenz von Ehrlich-Ascitestumorzellen wurde durch Inkubation mit fünf Enzymen *in vitro* stark herabgesetzt. Zwölf andere Enzyme hatten keine Wirkung. Die morphologischen Kriterien für Zellschädigung werden erörtert.

F. STECKERL, A. OFODILE, R. R. CAMPBELL, M. L. TURNER, and G. H. FRIEDELL

Department of Medicine and Pathology, Boston, University School of Medicine, Boston (Massachusetts), August 21, 1961.

[4] T. INAGAMI and J. M. STURTEVANT, J. biol. Chem. *235*, 1019 (1960).
[5] H. EAGLE, J. exp. Med. *102*, 37 (1955).
[6] L. H. GRAY, Radiation Res. Suppl. I (1959).

Nachweis von Corticosteroiden in menschlicher Placenta und Isolierung von 16α-Hydroxytestosteron[1]

Während der Gravidität kommt es zu einem erheblichen Anstieg des Blut- und Urinspiegels der Glucocorticoide[2–7] wie der Mineralcorticoide, insbesondere des Aldosterons[7–14]. Als Ursache scheint nicht so sehr eine erhöhte adrenale Sekretion als vielmehr ein verminderter Katabolismus des mütterlichen Organismus verantwortlich zu sein[15–17], wobei offen bleibt, ob eine Veränderung in Konjugation oder Clearance ebenfalls eine Rolle spielt.

Wie weit die Placenta selbst als Bildungsort für Corticosteroide in Frage kommt, liess sich aus den wohl zum Teil durch *species*-Unterschiede bedingten Befunden für [18–28] und gegen [15,17,29–31] eine solche Möglichkeit nicht erkennen.

In diesem Zusammenhang lag uns zunächst daran, in Nachprüfung verschiedener Literaturangaben[22,25,32–38] die Corticosteroide, insbesondere Aldosteron, in Placenten nachzuweisen.

Methoden. Der aus je 1 kg Gewebe erhaltene Acetonextrakt wurde durch Verteilung zwischen 70prozentigem Äthanol und Hexan entfettet und präparativ papierchromatographiert (Formamid/$CHCl_3$); nach Elution der

einzelnen Zonen rechromatographierte man analytisch in Bush C und anderen geeigneten Lösungsmittelsystemen und bestimmte die Konzentrationen mit Hilfe der Blau-Tetrazolium- und NaOH-Fluoreszenz-Reaktion. (Über Einzelheiten der papierchromatographischen Technik s. Angaben in [39].)

Im Fall der 30-kg-Charge wurde der entfettete $CHCl_3$-Extrakt (1,559 g) zuerst an Silicagel chromatographiert und die einzelnen Fraktionen präparativ und analytisch papierchromatographiert.

Zur Ausführung der anderen physikalischen Methoden und der chemischen Reaktionen vgl. [40].

Resultate. In einer ersten Serie untersuchten wir jeweils 1 kg Placenta-Gewebe und erhielten die in Tabelle I wiedergegebenen Werte.

Ein Nachweis von Corticosteron oder 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron gelang mit diesen kg-Chargen nicht (Nachweisgrenze 0,5 γ/kg). Im Bereich der Aldosteron-Zone liess sich jedoch immer eine UV-absorbierende, nicht-reduzierende Substanz (X_1) mit ähnlichen Laufeigenschaften wie Aldosteron nachweisen. X_1 erwies sich als dem 11-Dehydro-18-hydroxy-corticosteron sehr ähnlich [41], aber in 2 von 6 Systemen als nicht identisch.

Um festzustellen, ob sich nicht doch geringe Mengen Aldosteron in Placentagewebe nachweisen liessen, untersuchten wir eine gepoolte Menge von 30 kg Gewebe aus 55 Plazenten. Der durchschnittliche Gehalt ist in Tabelle II wiedergegeben.

Ausser Cortisol und Cortison konnten wir papierchromatographisch die isomeren 20-Dihydro-Metaboliten von Cortison identifizieren. Substanz X_1, die in diesem Material unter den UV-absorbierenden Substanzen in grösster Menge anfiel, liess sich nach Rechromatographie leicht kristallisieren und schmolz bei 185–187°. Ausser der gelben Fluoreszenz-Reaktion mit NaOH gab sie eine Farbreaktion mit Dinitrophenylhydrazin (negativ mit JKJ). Ein durch IR-Spektrum, Acetylierung, Perjodsäureoxydation und gründliche papierchromatographische Analyse erhobener Verdacht auf 16α-Hydroxytestosteron konnte schliesslich einwandfrei durch Misch-Smp. mit authentischem Material und durch Vergleich der IR-Spektren und der Absorptionsspektren in Schwefelsäure erhärtet werden.

Tab. I. γ Steroid/kg Placenta

Probe	Cortisol	Cortison	Corticosteron bzw. 11-Dehydro-corticosteron	Aldosteron
1	6	42	0	0
2	5	28	0	0
3	9	175	0	0
4	5	50	0	0
5	1	8	0	0
6	1	138	0	0
7	5	57	0	0

Tab. II. γ Neutralsteroide/kg Gewebe (aus 30 kg Placenten)

Cortisol	2,7
Cortison	20,7
Corticosteron	< 0,2
11-Dehydrocorticosteron	< 0,2
Aldosteron	< 0,2
X_1 = 16α-Hydroxy-testosteron	35,0
3,11-Diketo-17α,20β- und 20α-21-trihydroxy-Δ^4-pregnen	15,0

Diskussion. In Übereinstimmung mit den Angaben von Berliner et al. [37] konnten wir in der Reihenfolge abnehmender Konzentration Cortison, 20-Dihydrometaboliten von Cortison und Cortisol nachweisen, wobei unser Durchschnitt tiefer zu liegen scheint; dies könnte allerdings durch die verschiedene Beschaffenheit des Ausgangs-

[1] 184. Mitteilung über Steroide. 183. Mitteilung: E. H. Wehrli, M. Cereghetti, K. Schaffner, J. Urech und E. Vischer, Helv. chim. Acta *44*, im Druck (1961).
[2] E. H. Venning, Endocrinol. *39*, 203 (1943). – L. Tobian Jr., J. clin. Endocrinol. *9*, 319 (1949).
[3] G. Meyerheim und H. J. Hübener, Naturwiss. *39*, 482 (1952).
[4] C. A. Gemzell, J. clin. Endocrinol. *13*, 898 (1953).
[5] C. DeCourey, I. E. Bush, C. H. Gray und J. B. Lunnon, J. Endocrinol. *9*, 401 (1953).
[6] C. J. O. R. Morris und D. C. Williams, Biochem. J. *54*, 470 (1953).
[7] G. Stark, Arch. Gynäk. *192*, 519 (1960).
[8] E. H. Venning und J. Dyrenfurth, J. clin. Endocrinol. *16*, 426 (1956).
[9] J. D. Martin und I. H. Mills, Brit. Med. J. *2*, 571 (1956).
[10] E. H. Venning, T. Primrose, L. C. S. Caligaris und I. Dyrenfurth, J. clin. Endocrinol. *17*, 473 (1957).
[11] J. Genest, W. Nowaczynski, E. Koiw und B. Vitye, Clin. Research Proc. *5*, 15 (1957).
[12] W. Nowaczynski, E. Koiw und J. Genest, Canad. J. Biochem. Physicl. *35*, 425 (1957).
[13] M. G. Rinsler und B. Rigby, Brit. Med. J. *2*, 966 (1957).
[14] H. P. Wolff, R. Koczorek und E. Buchborn, Internat. Symposium on Aldosterone (Ed. Muller & O'Connor, Churchill, London 1958), p. 205.
[15] C. J. Migeon, J. Bertrand, P. E. Wall, R. S. Stempfel und H. Prystowsky, CIBA Found. Coll. Endocrinol. *11*, 338 (1957).
[16] K. M. Jones, R. Lloyd-Jones, A. Riondel, J. F. Tait, S. A. S. Tait, R. D. Bulbrook und F. C. Greenwood, Acta Endocrinol. *30*, 321 (1959).
[17] H. J. Staemmler, Klin. Wschr. *38*, 97 (1960).
[18] J. Plotz, Klin. Wschr. *31*, 831 (1953).
[19] T. Elsner, G. Geyer und H. Kölbl, Wien. Klin. Wschr. *1956*, 619.
[20] C. J. Migeon, H. Prystowsky, M. Grumbach und M. C. Byron, J. clin. Invest. *35*, 488 (1956).
[21] J. Schwarz und E. Pivel, Rapports 3. Réun. Endocrinol. Langue franç. *1955*, 32.
[22] H. J. Staemmler, Z. Geb. Gynäkol. *145*, 288 (1956).
[23] J. C. Laidlaw, M. Cohen und A. G. Gornall, J. clin. Endocrinol. *18*, 222 (1958).
[24] R. L. van de Wiele und J. W. Jailer, Ann. N.Y. Acad. Sci. *75*, 889 (1959).
[25] G. Telegdy, E. Endröczi und L. Huszár, Acta physiol. Acad. Sci. Hung. *17*, 57 (1960).
[26] P. S. Hench, Proc. Staff Meetings Mayo Clinic *13*, 161 (1938).
[27] P. S. Hench, E. C. Kendall, C. H. Slocumb und H. F. Polley, Proc. Staff Meetings Mayo Clinic *24*, 181 (1949).
[28] H. J. Robinson, W. G. Bernhard, H. Grubin, H. Wanner, G. W. Sewekow und R. H. Silber, J. clin. Endocrinol. *15*, 317 (1955).
[29] J. W. Jailer und A. J. Knowlton, J. clin. Investig. *29*, 1430 (1950).
[30] A. G. Hills, E. H. Venning, F. C. Dohan, G. D. Webster Jr. und E. M. Richardson, J. clin. Invest. *33*, 1466 (1954).
[31] A. Bernstein und J. Berger, Schweiz. Med. Wschr. *1956*, 1117.
[32] C. deCourcy, C. H. Gray und J. B. Lunnon, Nature *170*, 494 (1952).
[33] R. H. Johnson und W. J. Haines, Science *116*, 456 (1952).
[34] E. S. Gordon, J. J. Chart, D. Hagedorn und E. G. Shipley, Obstetr. and Gynecol. *4*, 39 (1954).
[35] J. J. Majnarich und R. N. Dillon, Arch. Biochem. *49*, 247 (1954).
[36] J. L. Mastboom, A. M. Cohen und M. van Garderen, Nederl. Tijdschr. Verlosk. *56*, 369 (1956).
[37] D. L. Berliner, J. E. Jones und H. A. Salhanick, J. biol. Chem. *223*, 1043 (1956).
[38] I. Endröczi, G. Telegdy und J. Martin, Acta physiol. Acad. Sci. Hung. *14*, 311 (1958).
[39] R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 1171 (1960).
[40] R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *39*, 2062 (1956).
[41] J. Schmidlin und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 973 (1960).

materials bedingt sein, in unserem Fall frisches Gewebe, im anderen tiefgefrorenes.

Es war uns hingegen nicht möglich, selbst im 30-kg-Ansatz 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron nachzuweisen. Obwohl aus Tabelle I hervorgeht, dass die Werte von Cortisol und Cortison von Placenta zu Placenta sehr stark schwanken, so können wir vorläufig für die Diskrepanz hinsichtlich des 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron keinen Grund angeben. Möglicherweise spielt hier eine variable Konzentrations- oder Retentionsfähigkeit des plazentaren Gewebes für Corticosteroide eine entscheidende Rolle[15,42,43]. Wir konnten auch keinen Hinweis dafür finden, dass anstelle von Aldosteron etwa 11-Dehydro-aldosteron[44] vorlag.

Nach Beendigung unserer Versuche ist eine ausführliche Arbeit von SIBULSKY und VENNING[45] über die Bildungsmöglichkeit von Corticosteroiden in menschlicher Placenta erschienen, welche in Übereinstimmung mit unseren Befunden steht. Da entwässertes Gewebe verwendet wurde, sind die angegebenen Werte in γ/100 g Gewebe bedeutend höher als unsere; trotzdem konnte von diesen Autoren weder 11-Dehydrocorticosteron noch Aldosteron nachgewiesen werden, und übrigens auch keine *in-vitro*-Bildung eines Corticosteroids durch menschliche Placenta.

SIBULSKY und VENNING beobachteten ebenfalls das Auftreten eines UV-absorbierenden, aber nicht reduzierenden Stoffes (X_1) von ähnlichen chromatographischen Eigenschaften wie Aldosteron. Soweit ihre Angaben einen Schluss erlauben, könnte es sich ebenfalls um 16α-Hydroxytestosteron handeln.

Im Fall unseres 30-kg-Ansatzes war die Konzentratio des 16α-Hydroxytestosteron sogar grösser als diejenig des Cortison. Soweit bisher bekannt, scheint dieses C_{19} Steroid selbst keine bemerkenswerten biologischen Wir kungen zu besitzen; es kann aber nach den Untersuchunge von RYAN[46] als placentarer Precursor von Östriol auf gefasst werden.

Summary. The occurrence of cortisol, cortisone, 20 dihydrometabolites of cortisone and several other steroid like compounds in fresh placental tissue is described Neither aldosterone, corticosterone nor 11-dehydrocorti costerone has been found. One of the most abundant com pounds present has been identified as 16α-hydroxy-testo sterone.

R. NEHER und G. STARK

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz), und Universitäts-frauenklinik Mainz (Deutschland), 17. August 1961.

[42] H. A. SALHANICK, J. E. JONES und D. BERLINER, Fed. Proc. Abstr. Nr. 1356 (1956).
[43] CL. MIGEON, J. BERTRAND und P. E. WALL, J. clin. Invest. *36*, 1350 (1957).
[44] J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN, in Vorbereitung.
[45] S. SYBULSKI und E. H. VENNING, Canad. J. Biochem. Physiol. *39*, 203 (1961).
[46] K. J. RYAN, J. biol. Chem. *234*, 2006 (1959).

Diurnal Rhythm in the Adrenal Ascorbic Acid Concentration of the Rat

It has been observed that a certain diurnal variation occurs in adrenal cortical function. In man, the corticoid content of urine and blood varies as a function of the time of day[1–3]. It has recently been suggested that the mouse and the rat also display a rhythmic variation, both in the content of plasma corticosteroids[4–6] and white cell count[4,5,7], and in the mitoses of the adrenal cortex[4,7].

The concentration of adrenal ascorbic acid is widely used as an indicator of adrenocortical activity in test animal studies[8,9]. No reports, however, have been found in the literature of possible diurnal variation in adrenal ascorbic acid concentration, and for this reason the present study was undertaken.

The test animals used were 70 male albino rats. These were divided into seven groups of 10 animals, taking care to ensure that the mean weight of the animals in each group was equal. The experiment was carried out in June, and no artificial illumination was therefore necessary. Ten animals were killed, by rapid decapitation with sharp scissors, every 4 h, starting at 0800 h. The adrenal glands were immediately removed from the surrounding tissue; they were weighed on a torsion balance, and then homogenized in 4% trichloroacetic acid. The content of total ascorbic acid in the homogenate was determined by the method of SCHAFFERT and KINGSLEY[10]. Student's 't'-test was used in the statistical treatment of the results.

The results are summarized in the Table, from which it can be seen that the adrenal ascorbic acid was at its lowest at 1600 h. The difference is statistically significant compared with both the 1200 group ($P < 0.01$) and the 1800 group ($P < 0.05$). The difference between the other groups is not statistically significant. These results are plotted in the graph of the Figure.

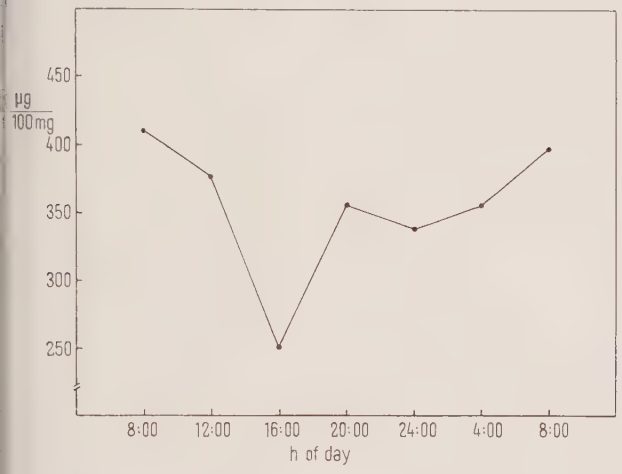
The Table also shows that the absolute weight of the adrenals was greatest at 2400 h, i.e. at midnight. Th difference is significant both against the 2000 grou ($P < 0.01$) and the 0400 group ($P < 0.05$).

Body weight, weight and ascorbic acid concentration of the adrena glands at various times of day

Hour of day	Number of animals	Body weight g		Adrenal glands weight mg		ascorbic aci µg/100 mg fresh tissue	
		Mean	S. D.	Mean	S. D.	Mean	S. D.
0800	10	223	20.5	37.1	7.5	410	50.7
1200	10	223	18.2	40.0	6.9	377	85.2
1600	10	223	17.7	37.6	7.0	251	87.3
2000	10	223	22.0	36.4	4.0	356	91.8
2400	10	223	37.4	45.4	8.5	349	88.3
0400	10	223	30.8	37.9	6.5	356	99.9
0800	10	223	17.5	36.5	6.1	398	66.3

[1] R. P. DOE, E. B. FLINK, and M. G. GOODSELL, J. clin. Endocr. *16*, 196 (1956).
[2] R. E. PETERSON, J. clin. Endocr. *17*, 1150 (1957).
[3] B. THOMASSON, Scand. J. clin. Lab. Invest. *11*, Suppl. 42 (1959).
[4] F. HALBERG, R. E. PETERSON, and R. H. SILBER, Endocrinology *64*, 222 (1959).
[5] R. GUILLEMIN, W. E. DEAR, and R. A. LIEBELT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *101*, 394 (1959).
[6] J. L. MCCARTHY, R. C. CORLEY, and M. X. ZARROW, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *104*, 787 (1960).
[7] F. HALBERG, M. J. FRANTZ, and J. J. BITTNER, Anat. Rec. *129*, 349 (1957).
[8] G. SAYERS, Physiol. Rev. *30*, 241 (1950).
[9] M. A. SLUSHER and S. ROBERTS, Endocrinology *67*, 873 (1960).
[10] R. R. SCHAFFERT and R. KINGSLEY, J. biol. Chem. *212*, 59 (1955).

These results indicate that there is a diurnal variation in the adrenal ascorbic acid concentration. It is interesting to note that the depletion of adrenal ascorbic acid occurred at 1600 h, since other investigations have shown that the corticoid level in the blood of the rat[5], and also of the mouse[4], is at its highest at this time. This tends to support the theory that the adrenal ascorbic acid concentration is a good indicator of adrenocortical activity and that it may be of importance in the synthesis and/or release of corticoids[8,11]. From the practical point of view, too, it is useful to know that a reduction of this order occurs in the concentration of adrenal ascorbic acid in the afternoon. As a result, critical experiments by which depletion of adrenal ascorbic acid is induced should, wherever possible, be carried out during the morning.



Daily change in adrenal ascorbic acid concentration of the rat.

The increase in the weight of the adrenals noted at midnight is in conformity with observations that the number of mitoses in the adrenal cortex is highest at this hour[4,7]. Evidently there may be a time lag between adrenocortical activity (indicated by increased corticoid level of the blood and by adrenal ascorbic acid depletion) and cortical hyperplasia (indicated by increased number of mitoses in the cortex and increased adrenal weight).

As for the similarity between the diurnal rhythm of the adrenal cortical function in man and in the rat, a temporal difference is noted. The human adrenal function is at its highest in the morning[1–3]. The fact that the rat is a nocturnal animal has been put forward as an explanation for this difference[4,5].

Previous reports suggest that the nervous system is the site of the regulator primarily responsible for the diurnal cyclicity of adrenocortical activity[12,13].

Zusammenfassung. Der tägliche Rhythmus des Ascorbinsäuregehalts in den Nebennieren von Ratten wurde untersucht. Es wurde beobachtet, dass der Ascorbinsäuregehalt um 16 h nachmittags am geringsten ist. Das absolute Gewicht der Nebennieren wiederum ist in der Nacht gegen 24 h am höchsten. Bei praktischen Arbeiten ist dieser Abfall im Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren am Nachmittag zu berücksichtigen.

U. K. Rinne[14] and O. Kytömäki

Department of Anatomy, University of Turku (Finland), August 7, 1961.

[11] H. S. Lipscomb and D. H. Nelson, Endocrinology *66*, 144 (1960).
[12] J. W. Mason, Intern. Symposium on Reticular Formation of the Brain (Little, Brown & Company 1958), p. 645.
[13] K. B. Eik-Nes and L. D. Clark, J. clin. Endocr. *18*, 764 (1958).
[14] Aided by a grant from the Sigrid Jusélius Stiftelse.

Magnetic and Photic Responses in Snails[1]

Since the first report of a magnetic response in the mud snail *Nassarius obsoleta*[2] a number of remarkable characteristics of this orientation reaction have been disclosed[3–5] and demonstrations of its occurrence extended to include *Paramecium*[6], *Planaria*[7], and *Drosophila*[8].

In the snail studies animals were permitted to emerge from a narrow corridor into a symmetrical field which was constant for factors normally regarded as capable of influencing their orientation. Under these conditions mean angle of orientation of the snail paths displayed both solar and lunar variations. This angle could be altered quantitatively by a weak magnetic field in a predictable manner dependent upon direction and magnitude of the horizontal component, hour-angle of sun and moon, and lunar elongation.

More recently the relationship between magnetic and photic responses in snails has been examined. The present paper reports further analysis of some preliminary results which have already been described briefly[9].

Materials and Methods. The apparatus and procedure for obtaining data have been recounted elsewhere[3]. In brief, the amount of turning of snails was measured after 3 cm of free movement following their emergence from a narrow corridor directed magnetic south. The orientation apparatus was situated within a white box which provided the constant light field. This field was made asymmetrical by lining the inside right or left half of the box with mat black cardboard. When the cardboard liner was in place incident illumination in all cases was 150 lux from above, 20 lux from the black side, and 60 lux from the white side.

Every experiment comprised two series; a series constituted ten snail emergencies in each condition of the following sequence: (1) in the earth's magnetic field into symmetrical illumination, (2) in the earth's magnetic field into asymmetrical illumination black to left and white to right, (3) same illumination as (2) but in a 5-gauss horizontal magnetic field oriented in reverse to the earth's, (4) same as in (1), (5) in the earth's magnetic field with asymmetrical illumination black to right and white to left,

[1] This study was aided by a grant from the National Science Foundation, No. G-15008, and by a contract between the Office of Naval Research, Department of Navy, and Northwestern University No. 1228-03.
[2] F. A. Brown, M. F. Bennett, and W. J. Brett, Biol. Bull. *117*, 406 (1959).
[3] F. A. Brown Jr., W. J. Brett, M. F. Bennett, and F. H. Barnwell, Biol. Bull. *118*, 367 (1960).
[4] F. A. Brown Jr., H. M. Webb, and W. J. Brett, Biol. Bull. *118*, 382 (1960).
[5] F. A. Brown Jr., M. F. Bennett, and H. M. Webb, Biol. Bull. *119*, 65 (1960).
[6] F. A. Brown Jr., Paramecium, unpublished manuscript (1961).
[7] F. A. Brown Jr., Dugesia, unpublished manuscript (1961).
[8] F. A. Brown Jr., unpublished experiments.
[9] F. A. Brown Jr. and A. Huttrer, Biol. Bull. *119*, 306 (1960).

(6) same illumination as (5) but in a 5-gauss horizontal field oriented as in (3). Between July 14 and 22 (1960), eighteen such experiments were performed; six during the mornings, 8 a.m. to 12 m; six during the afternoons, 1:30 to 5 p.m.; and six during the evenings, 6 to 9 p.m. For convenience in the following discussion animals orienting in symmetrical illumination will be referred to as controls.

Results. Several points are evident from the data as they are summarized in Figure 1. First, the average amount of turning in controls varies throughout the day in a manner entirely consistent with the mean daily pattern reported for the summer of 1959, maximum left turning over the noon hour and decreased left turning in the late afternoon and evening. Second, amount of turning in the asymmetrically illuminated fields varies throughout the day in a like manner. However orientations in the two asymmetrical fields, black to left and black to right, are not equivalent in the snails, and for this reason they will be described separately.

Black to left, white to right. The correlation between amount of turning in animals in asymmetrical illumination and amount of turning in controls is much more specific than for three average values for quarters of the day depicted in Figure 1. The relationship extends to within the individual experimental series and is of high statistical significance (Figure 2C). It is notable that the correlation is patent within each of the three groups for quarters of the day and that their combination comprises a homogeneous population. The relationship is not grossly altered when the photic response occurs in the imposed 5-gauss field (Figure 2D).

Black to right, white to left. In Figure 1 it can be seen that differences between turning of the controls and turning in the asymmetrical field are not so uniform as in the previous case. In fact differences for the twelve morning experimental series are significantly less than differences for afternoon and evening series combined, $P < 0.01$. Furthermore the correlation between turning of controls and turning in the asymmetrical field is considerably lower within individual series (Figure 2A). Inspection of the scatter diagram makes it clear that this differential in correlation coefficients cannot be attributed solely to the morning group of values; actually within this group the correlation is much higher than it is among the evening values. However, in Figure 2 B it is seen that the artificial magnetic field conspicuously increases the degree of association. By appropriate correlation methods[10] it can be shown that photic response in the augmented magnetic field correlates significantly higher than photic response in the earth's magnetic field with orientation of controls, $t = 3.06$, $P < 0.01$.

An explanation can be offered for the magnetic effect in the following way. A measure of the consistency of the photic response for individual experiments was got by correlating the average amount of turning in the first experimental series with the average amount of turning under the same condition in the second experimental series. The results of these intra-experiment correlations are depicted in Figure 3. In asymmetrical illumination with black to left consistency is quite high (Figure 3C). There is a suggestion of reduced consistency in the artificial magnetic field (Figure 3D). To the contrary, photic response in asymmetrical illumination with black to right is substantially less consistent within individual experiments than with black to left, $P = 0.015$ (Figure 3A). In the 5-gauss magnetic field the relationship is considerably augmented (Figure 3B). Presumably then, the increase in consistency of response in the 5-gauss field accounts for the increased coefficient of correlation attributed to the magnet in Figure 2B. The intra-experimen correlation coefficient of the controls for black to righ was + 0.71 and for black to left, + 0.52.

Conclusions. The correlation between orientation t asymmetrical illumination and concomitant orientatio in symmetrical illumination is of some consequence in th

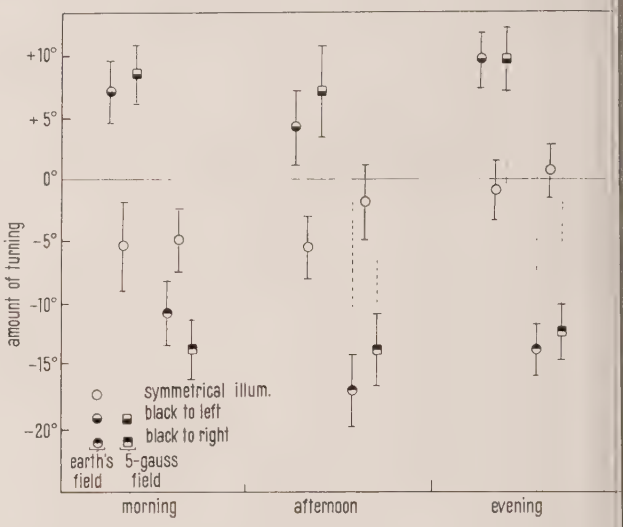


Fig. 1. Summary of results for three quarters of the day. Each poin represents 120 individual orientations. Dashed lines associate ex perimentals with their controls. Standard errors are indicated.

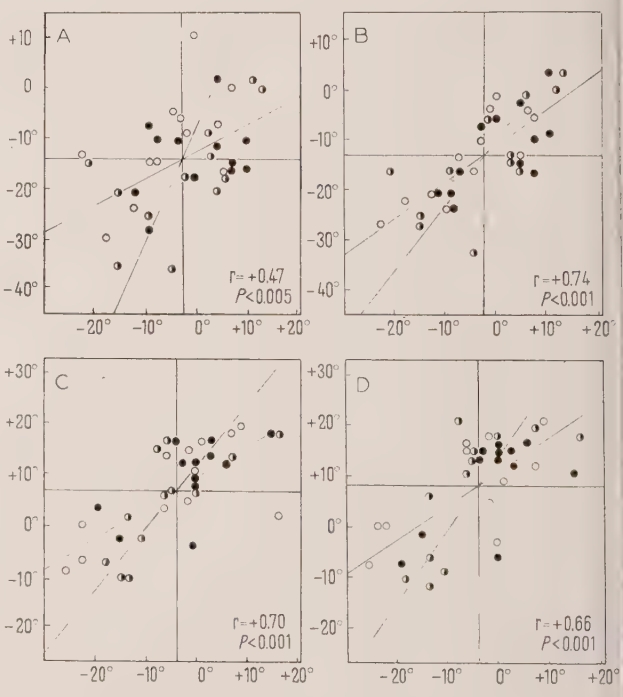


Fig. 2. Relationships of amount of turning in the asymmetrically illuminated field (ordinate) to amount of turning in the symmetrically illuminated field (abscissa). A. In earth's magnetic field, black to right. B. In 5-gauss magnetic field, black to right. C. In earth's magnetic field, black to left. D. In 5-gauss magnetic field, black to left. Open circles are morning experiments; half circles, afternoon; closed circles, evening.

[10] G. McNEMAR, *Psychological Statistics*, 2nd edition (John Wiley & Sons, Inc., New York 1955).

orientation reactions of the snails. It reveals that whatever factors are regulating the orientation of snails in a constant field participate most significantly in the photic response of the organisms. It has been suggested earlier that the snail orientational response might involve a compass reaction to the fixed directional component of the experimental light source. More recent studies, however, using planarians and eliminating all horizontal directional light cues[7] and further studies with snails involving only compass-direction changes[11] have indicated that a simple compass response to light does not adequately account for the phenomenon. The role of the regulating factors may be so great as to bring about what appear to be qualitative differences in the light response. For example, in Figure 2C within the range of data presented there are controls at all three times of day turning so strongly negatively that the turning of animals associated with them in the asymmetrical field is apparently a *negative* phototaxis. Furthermore, the ability to account for 50% of the variance in the orientation of snails in asymmetrical light (Figure 2C) in terms of orientation of controls clearly points up the methodological value of having a reference, or base line, such as is provided by the controls in these experiments.

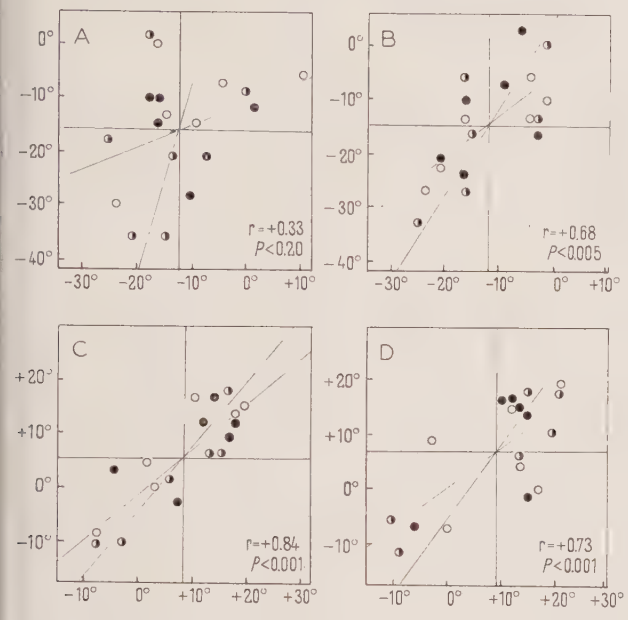


Fig. 3. Consistency of photic response measured by intra-experiment correlations. Ordinate is average of first ten runs; abscissa, average of second ten runs. A. In earth's magnetic field, black to right. B. In 5-gauss magnetic field, black to right. C. In earth's magnetic field, black to left. D. In 5-gauss magnetic field, black to left. Symbols are same as in Figure 2.

It is also evident from this analysis that phototaxis in *Nassarius* may be remarkably asymmetrical. Roles of physiological asymmetries in various photic responses of animals have been recognized for a number of years[12]. In *Nassarius* the asymmetry is of a labile nature and can be significantly altered by a weak magnetic field. This relationship is currently under investigation.

Zusammenfassung. Das Ausmass, in dem sich die Schnecke *Nassarius obsoleta* asymmetrischem Licht zuwendet, ist einer früher beschriebenen Orientierungsreaktion übergeordnet, die selbst bei symmetrischer Beleuchtung eintritt. Ausserdem lässt diese Lichtreaktion eine physiologische Asymmetrie erkennen, die durch ein schwaches magnetisches Feld geändert werden kann.

F. H. Barnwell and F. A. Brown Jr.

Department of Biological Sciences, Northwestern University, Evanston (Illinois), July 24, 1961.

[11] F. A. Brown Jr. and H. M. Webb, Biol. Bull. *119*, 307 (1960).
[12] For a discussion of cases in a variety of organisms see: G. Fraenkel and D. L. Gunn, *The Orientation of Animals*. Monogr. Anim. Behav. (Oxford 1940).

Form und Zellzahl der akustischen Nervenzentren in der Medulla oblongata von Eulen (*Striges*)

Von der Annahme ausgehend, dass die Ausbildung eines nervösen Zentrums in Beziehung zu den darin ablaufenden Prozessen steht, wurden die Kerngebiete im Einstrahlungsbereich des Hörnerven von Eulen untersucht. Der untere Teil der Hörbahn von Vögeln besteht aus dem primären Ggl. cochleare, den sekundären Nucl. magnocellularis und Nucl. angularis sowie dem tertiären Nucl. laminaris. Der letztgenannte Kern wird von den Nuclei magnocellulares beider Seiten mit Fasern versorgt. Ventral von den genannten Zentren liegt der Nucl. olivarius superior, an den vermutlich sowohl sekundäre wie tertiäre Fasern herantreten[1–5].

Insgesamt wurden 12 Gehirne von 5 Eulenarten histologisch verarbeitet und zum Vergleich auch mehrere Singvogel-Gehirne herangezogen (Tabelle). Nach Serienschnitten von 10 bis 20 μ wurde die Anzahl der akustischen Nervenzellen bestimmt und 30fach vergrösserte Modelle hergestellt. Auf Grund von Kontrollen wird ein Zählfehler von $\pm$ 15% angenommen.

Schon äusserlich lässt das Einstrahlungsgebiet des Hörnerven vor und unter den Kleinhirnschenkeln bei den Eulen eine stärkere Anschwellung als bei tagaktiven Vögeln erkennen, durch die der 4. Ventrikel eingeengt wird. In Schnitten zeigt sich die starke Ausprägung des dorso-lateral die «Ecke» der Medulla formenden Nucl. angularis, der eine ventrale Längsfalte bildet (Figur). Etwas caudal von diesem Kern tritt auch der Nucl. magnocellularis dorsal an die Aussenkante der Medulla heran und zieht dann schräg nach rostro-medial. Seine Hauptmasse liegt im caudalen Abschnitt der Längenerstreckung, umgekehrt wie beim Nucl. angularis. Innerhalb des Nucl. magnocellularis wird ein lateraler und medialer Teil durch Grösse und Anfärbbarkeit der Zellen unterschieden.

Auch der Nucl. laminaris ist bei allen Eulenarten sehr umfangreich; die Ausbildung lässt Unterschiede innerhalb der Ordnung erkennen. Bei *Athene* und *Bubo*, die schon in der Dämmerung aktiv werden, liegen die Verhältnisse noch ähnlich wie bei den untersuchten *Oscines*. So finden wir am lateralen Rande der caudalen Kernhälfte eine

[1] F. Brandis, Arch. mikr. Anat. *43*, 96 (1894).
[2] S. R. Cajal, Trab. Lab. Rech. Biol. Univ. Madrid *6*, 195 (1908).
[3] K. L. Chow, J. comp. Neurol. *95*, 159 (1951).
[4] G. Holmes, Trans. Roy. Acad. *32*, 101 (1903).
[5] A. Kappers, in *Handb. vergl. Anat. Wirbeltiere* (Bolk, Göppert, Kallius, Lubosch, Berlin und Wien 1934), vol. 2/1, p. 319.

Zellzahlen aus den medullären Kerngebieten des Acusticus von Vögeln («reduziert» auf 100 g Körpergewicht gem.: Zellzahl = $k \cdot G_{körper}^{0,17}$)

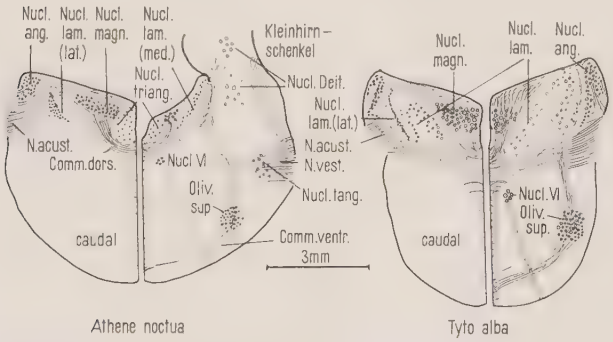
	Körper-gewicht (g)	Nucleus magno-cellularis	Nucleus angularis	Nucleus laminaris	Nucleus olivarius superior	Gesamt-Zellzahl	«reduzierte» Gesamt-Zellzahl
Athene noctua	183	3450	2750	2490	2550	11240	10120
Tyto alba	278	15760	9960	10020	11830	47570	40950
Asio otus	293	10810	5060	8340	4460	29280	24360
Strix aluco	452	11070	5930	6920	4770	28680	22150
Bubo bubo	2800	7890	4980	5070	4310	17950	10100
Pica pica	213	4460	2870	2500	1850	11690	10280
Corvus corone	533	5160	4320	2540	2030	13560	10180

Gruppe besonders kleiner Zellen (Pars lateralis). Bei *Asio* setzt eine Faltung ein, die bei *Tyto* fast zu einer Abgliederung der umfangreichen Pars lateralis vom Nucl. laminaris (Pars medialis) führt. Eine ähnliche Differenzierungsreihe gilt für die «obere Olive», die bei *Athene* und *Bubo* nur wenig schärfer von der retikulären Umgebung abgegrenzt ist als bei den Tagvögeln. *Strix* und *Asio* haben relativ umfangreiche und besser definierte Kerngebiete, die bei *Tyto* ihre deutlichste Ausprägung erreichen. Sie stehen allerdings auch bei dieser noch weit hinter denen der Säuger zurück.

Die in der Tabelle aufgeführten Anzahlen von Nervenzellen geben ein quantitatives Mass für die Bedeutung der Kerngebiete bei der Verarbeitung akustischer Nachrichten. Die Schleiereule steht hinsichtlich der Gesamtzellzahl mit Abstand an der Spitze, was in Beziehung zur rein nächtlichen Lebensweise zu bringen ist. Es folgen Waldohreule und Waldkauz, während Uhu und Steinkauz ähnliche Werte wie Krähe und Elster ergeben. Beim Vergleich von Nucl. magnocellularis und Nucl. angularis mit den (ebenfalls sekundären) Nuclei cochleares vom Rhesusaffen (ca. 90000 Zellen nach CHOW[3]) steht die Schleiereule um mehr als das Dreifache, der Uhu um das Sechsfache zurück.

Schon LAPIQUE[6] hat gezeigt, dass das Gehirngewicht von Vögeln nach der Gleichung $G_{gehirn} = k \cdot G_{körper}^{0,56}$ vom Körpergewicht abhängt; entsprechendes gilt für die Trommelfellfläche und die Schneckenlänge[7]. Daher wurde eine ähnliche Beziehung auch für die Zahl der Nervenzellen erwartet. Wir haben den Gewichtsexponenten für die Gesamtzellzahl von *Athene* und *Bubo* sowie von *Pica* und *Corvus* berechnet und 0,169 bzw. 0,161 erhalten, statt der erwarteten 0,56. Auch Ausdehnung der Berechnung auf kleine Singvögel (*Parus atricapillus* und *Passer domesticus*) ergab nur einen Gewichtsexponenten (zum Uhu) von 0,20. Eine Einbeziehung der offensichtlich durch funktionelle Anpassung stark beeinflussten, weil nach dem Gehör jagenden Eulenarten in die Berechnung ist nicht sinnvoll. Der gefundene Gewichtsexponent (0,16–0,20) bedeutet, dass mit steigendem Körper- und Gesamt-Gehirngewicht die Zahl der akustischen Nervenzellen der Medulla relativ nur sehr wenig zunimmt; hieraus ist auf die Verarbeitung akustischer Nachrichten zu schliessen. Es bleibt offen, ob Zunahme an Zellgrösse, an Fasermasse, an Gliazellen oder an Zellen anderer Gehirnteile hierfür kompensieren[8].

In der letzten Säule der Tabelle haben wir, ausgehend von der Beziehung: Zellzahl = $k \cdot G_{körper}^{0,17}$ die «reduzierte» Gesamtzellzahl für idealisierte Vögel von 100 g Körpergewicht berechnet. Die Sonderstellung der nächtlich jagenden Eulenarten tritt hierbei besonders hervor. Dagegen sind die Werte für *Athene*, *Bubo*, *Pica* und *Corvus* jetzt praktisch gleich (auch für *Parus* und *Passer*). Dies bedeutet, dass den genannten Eulen- und Singvögeln ausser dem gleichen Gewichtsexponenten (0,16–0,20) auch die Proportionalitätskonstante (k) gemeinsam ist.



Querschnitte durch die Medulla von Eulen; rechte Hälfte jeweils auf der Höhe des caudalen Endes vom Kern des VI. Hirnnerven, linke Hälfte 500 μ weiter caudal.

Summary. The special form and the number of nerve cells of the auditory centres in the owl's medulla are described and compared with those of other birds. The highest degree of differentiation is found in the most nocturnal species, *Tyto alba*. Comparing the number of auditory nerve cells in the medulla with the weight of the brain in birds of different size, an unexpectedly low rate of increase was found.

P. WINTER und J. SCHWARTZKOPFF

Zoologisches Institut der Universität München (Deutschland), 10. Juli 1961.

[6] L. LAPIQUE, Bull. Soc. Anthrop. Paris *8*, 248 (1907).
[7] M. B. RENSCH, Naturw. *45*, 175 (1958).
[8] J. SCHWARTZKOPFF, Z. Morph. Ökol. Tiere *45*, 365 (1957).

Versuche zur Spezifität des Feinderkennens durch Trauerschnäpper[1]

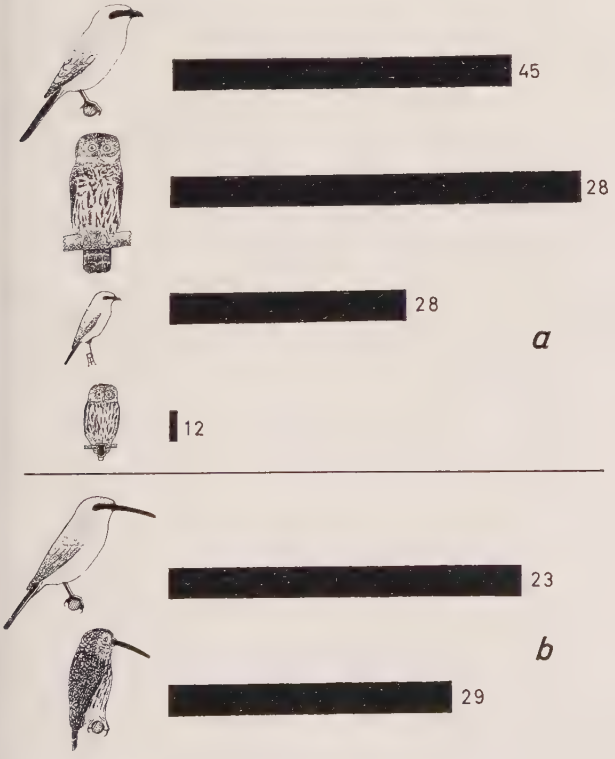
Spanische Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca iberiae*) hassen auf den Rotrückenwürger (*Lanius collurio*) nur etwa ein Siebentel so stark wie deutsche (*F. hypoleuca hypoleuca*). Auf den Waldkauz (*Strix aluco*), einen zweiten Raubfeind, aber hassen beide Rassen etwa gleich stark. Dazu passt, dass der Würger in Spanien fehlt, der Kauz aber fast ganz Europa bewohnt[2]. Solch rassenspezifisches Feindverhalten wirft die Frage auf, ob dem Ansprechen von Würger und Kauz je ein spezifischer Auslösemechanismus zugrunde liegt, in welchem jeder von beiden durch

[1] Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
[2] E. CURIO, Exper. *17*, 188 (1961).

mindestens einen nur ihm *eigenen* Schlüsselreiz repräsentiert ist, oder ob beide Feindtypen in den Auslösemechanismus *eines* ruhenden Flugfeindes passen, in welchem die alarmauslösenden Merkmale des Würgers bei *iberiae* auf erhöhte Schwellen stossen.

Ein möglicher und einfacher Weg zur Lösung der Frage geht von der Überlegung aus, dass Würger und Kauz einige Merkmale gemeinsam haben; diese sind zwar dem Schnäpper ebenso sichtbar wie uns, brauchen aber nicht unbedingt Schlüsselreize für die Alarmhandlung zu sein, das heisst Reize, die die Stärke der Antwort quantitativ beeinflussen. Die künstliche Abänderung eines Feindes im Attrappenversuch muss also zunächst die Unkenntnis darüber in Kauf nehmen, ob eine bestimmte Eigenschaft Schlüsselreiz ist oder nicht. Veränderte man *dasselbe* Merkmal an beiden Feinden auf *gleiche* Weise, so sollte, falls nur *ein* Auslösemechanismus anspricht, die Antwortstärke in beiden Fällen um etwa denselben Betrag und in gleicher Richtung abweichen, aber um einen eindeutig verschiedenen Wert, wenn zwei verschiedene Erkennungsapparate vorliegen. – Aus Vergleichsgründen empfiehlt es sich, in beiden Feindgruppen von *gleich grossen* Vertretern auszugehen, sobald die tiergeographische Fragestellung in den Hintergrund tritt. Rotrückenwürger und Sperlingskauz (*Glaucidium passerinum*) zum Beispiel teilen eine annähernd aufrechte Haltung, dieselbe Grösse (Abstand Fussansatz-Scheitel), die befiederte Oberfläche und einen Hakenschnabel in etwa gleicher Lage. Der Sperlingskauz kommt im Untersuchungsgebiet von *hypoleuca* nicht vor und auch andernorts kaum im selben Lebensraum.

In Versuchen an freilebenden, fütternden Vögeln der Rasse *hypoleuca* in Hessen (Frankfurt-Fechenheim, Frankfurter Stadtwald, Bad Orb, Wegscheide, Schiffenberg/Giessen, Hohe Mark)[3] prüfte ich zunächst die Wirksamkeit eines Sperlingskauzbalges 1,5 m vor der Nisthöhle und verglich sie mit derjenigen eines Rotrückenwürger-Männchenbalges, der einzigen in Berlin, aber mit derselben Methode geprüften Attrappe. Jeder Vogel wurde nur *einmal* getestet, weil die Darbietung einer Attrappe die auslösende Wirkung einer ihr folgenden zweiten heben *oder* senken könnte, je nach ihrem Stärkeverhältnis[4].



Hassen fütternder Trauerschnäpper auf Feindattrappen 1,5 m vor der Nisthöhle. Von oben nach unten: Rotrückenwürgermännchenbalg, Sperlingskauzbalg, auf die Hälfte verkleinerte Plastikamodelle beider Feinde; dieselben Bälge wie oben mit mattschwarzem Schnepfenschnabel aus Holz. Zahlen = geprüfte Individuen = Versuche. Stärke der Antwort auf den Würgerbalg: 80 Rufe/min.

Auf den Würger hasst der Trauerschnäpper mit durchschnittlich 80 Rufen/min, auf den Kauz wahrscheinlich etwas stärker, zumindest aber nicht schwächer ($P = 5{,}2\%$)[5]; auch übertreffen die stärksten Kauzalarme mit 181 Rufen/min die stärksten Würgerantworten, nämlich 137 Rufe/min (Figur a).

Verkleinert man Würger und Kauz mit Hilfe bemalter Modelle proportionsgerecht auf die *Hälfte* und bietet sie ebenso dar, so sinkt die Alarmstärke beim Kauz auf 2,1%, beim Würger aber auf nur 69,8% des Ausgangswertes ab (Figur a); die so erzielte Abschwächung des Würgers könnte noch im Zufallsbereich liegen ($P = 5{,}7\%$), die des Kauzes aber nicht mehr. (Da Würgerbalg und naturgetreues Würgermodell beinahe gleich stark wirken, was hier nicht abgebildet sei, müssen hierfür fast ausschliesslich die veränderte Körpergrösse und nicht die veränderten Oberflächeneigenschaften verantwortlich sein.) Während also Normalwürger und Normalkauz etwa gleich stark Alarm auslösen, stört die künstliche Verzwergung beider nur die auslösenden Eigenschaften des Kauzes, aber kaum die des Würgers. Dieser Befund zwingt zu der Annahme mindestens *zweier* spezifischer Auslösemechanismen für ruhende Flugfeinde in Nestnähe, in denen mindestens ein Merkmal, nämlich die Körpergrösse, unterschiedlich verrechnet wird. Spätere Versuche müssen klären, ob es weitere Erkennungsmechanismen für andere biologisch bedeutsame Feinde gibt.

Ergänzende Versuche, in denen sowohl dem Kauz- wie dem Würgerbalg ein schwarzer Schnepfenschnabel aus Holz geschnitzt aufgesetzt wurde, führten zu keinem eindeutigen Ergebnis (Figur b). Normalkauz und Schnepfenschnabelkauz sind kaum voneinander verschieden ($P = 5{,}2\%$). Die Veränderung scheint aber den Kauz zu beeinträchtigen und den Würger zu verstärken. Wären die Abweichungen von den Ausgangswerten nach verschiedenen Richtungen real, so spräche auch dies für zwei Auslösemechanismen. – Ganz ähnlich stört ein Schnepfenschnabel das Eulenerkennen handaufgezogener Rotrückenwürger empfindlich (v. St. Paul, unveröffentlicht).

Summary. Pied flycatchers (*Ficedula h. hypoleuca*) possess at least two releasing mechanisms for triggering the mobbing response to predators near the nest, namely for shrikes and for owls. This is demonstrated by the fact that body size, which was varied in dummy experiments, enters into these mechanisms differentially.

E. Curio

Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen über Starnberg/Obb. (Deutschland), 29. Juni 1961.

[3] Herrn Dir. S. Pfeifer und Herrn Dr. W. Keil (beide Vogelschutzwarte Frankfurt) danke ich wärmstens für Beratung und Gastfreundschaft.

[4] R. A. Hinde, Proc. Roy. Soc. *B 153*, 398 (1960).

[5] Weil keine der hier verglichenen Messreihen einer Normal-Verteilung gehorcht, verbietet sich Students «t»-Test und empfiehlt sich Wilcoxons Rangtest zur Prüfung der jeweiligen Mittelwertsdifferenz (vgl. B. L. van der Waerden, *Mathematische Statistik* (Springer-Verlag 1957), p. 269), auf den mich freundlicherweise Herr Prof. Dr. Baitsch (Freiburg) hinwies.

Die Wirkung der Ultraviolettbehandlung auf die Überlebensverhältnisse röntgenbestrahlter Mäuse

Die Ultraviolettbehandlung hat bei weissen Mäusen eine beträchtliche Erhöhung der Thrombozytenzahl zur Folge. In der Hervorrufung der tagelang anhaltenden UV-Thrombozytose spielt ein humoraler Faktor, der sogenannte UV-thrombopoetische Faktor, eine wesentliche Rolle. Das 24 h nach der Behandlung von UV-behandelten Mäusen gewonnene Serum bewirkt – ähnlich wie die direkte UV-Behandlung – bei den normalen Rezipienten eine Erhöhung der Thrombozytenzahl. Der humorale Ursprung der UV-Thrombozytose konnte auch in Parabioseversuchen[1,2] erwiesen werden. Zum Studium der Entstehung und der Wirkungsweise des UV-Serumfaktors haben wir in weiteren Versuchen kombinierte UV- und Röntgenbestrahlung angewandt. Es zeigte sich, dass die UV-Behandlung – zu einem entsprechenden Zeitpunkt vorgenommen – die durch die Röntgenbestrahlung bedingte Thrombozytopenie verhindert und die Röntgenbestrahlung die Entstehung des vor der Thrombopenie schützenden UV-Faktors hemmt[3]. Zur weiteren Untersuchung des gegensätzlichen Effektes der beiden Strahlungen haben wir die Wirkung vorhergehender UV-Behandlung auf die Sterblichkeit von mit massiven Röntgendosen bestrahlten Mäusen verfolgt.

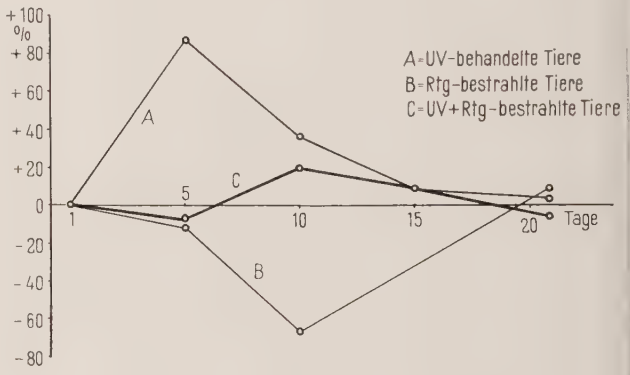
Experimenteller Teil. Die Versuche wurden an durchschnittlich 20 g schweren, bei gemischter Kost gehaltenen Albinomäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt, deren einzelne Gruppen demselben Stamm angehörten. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Hanau-Quarzlampe (210 V, 5,2 A) aus 50 cm Entfernung 30 min lang. Daten der Röntgenbestrahlung: Siemensscher «Stabilivolt» Tiefentherapie-Apparat, 180 kV, 10 mA, 0,5 Cu-Filter, Dosisleistung 23,3 r/min (Luftdosis). Ganzkörperbestrahlung aus 150 cm Fokus-Hautdistanz. Die Bestrahlung der in eine Gruppe gehörenden Kontroll- und vorbehandelten Tiere wurde gleichzeitig und unter analogen Verhältnissen vorgenommen. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte mit der direkten Feissly-Lüdinschen phasenkontrastmikroskopischen Methode in der Modifikation von FISCHER und GERMER[4]. Die Überlebenszeit drückt die Mittelwerte der innerhalb der Dauer von 30 Tagen auf ein Tier entfallenden Überlebenstage aus. Die Ergebnisse wurden mit dem χ^2-Verfahren mathematisch ausgewertet.

Die Figur veranschaulicht die Wirkung der UV- und Röntgenbestrahlung bzw. der kombinierten Bestrahlung auf die Thrombozytenzahl der Mäuse. Die UV-Behandlung (30 Mäuse) hatte am 5. Tage eine Erhöhung der Thrombozytenzahl um 90% (A) zur Folge. Auf die Wirkung einer Röntgendosis von 300 r (10 Mäuse) kam eine bedeutende Verminderung der Thrombozytenzahl zustande, die am 10. Tage 61% ausmachte (B). Wurde 24 h vor der Röntgenbestrahlung eine UV-Behandlung angesetzt (10 Mäuse), so ergab sich anstatt des Abfalles am 10. Tage ein Anstieg um 21% (C).

Tabelle I enthält die auf die Sterblichkeit der mit 500, 550 und 600 r bestrahlten Mäuse bezüglichen Daten. Es wurde ein Vergleich zwischen der Mortalität von nur röntgenbestrahlten Mäusen und solchen, die 48 und 24 h zuvor UV-bestrahlt worden waren, angestellt. Der Unterschied ist nur in der mit 550 r bestrahlten Gruppe, in der die Zahl der untersuchten Tiere am kleinsten war, nicht signifikant (Tabelle I). Auch der Durchschnittswert der Überlebenstage ist bei der UV-vorbehandelten Gruppe grösser (Tabelle II).

Besprechung. Die 24 h vor der Röntgenirradiation angewandte UV-Behandlung verhindert die durch 300 r verursachte Thrombopenie. Es lag auf der Hand, auch die Wirkung der UV-Behandlung auf die Sterblichkeit von grossen Röntgendosen ausgesetzten Mäusen zu untersuchen. Die 48 bzw. 24 h vor der Röntgenbestrahlung vorgenommene UV-Behandlung verbessert die Überlebenserwartung der Tiere wesentlich und erhöht die Durchschnittszahl der Überlebenstage.

Von den zahlreichen Strahlenschutzmitteln sind vor allem die Sulfhydryl- (SH-)Gruppen enthaltenden Verbindungen (Cystein, Glutathion und Cysteamin) und die protektive Wirkung der Knochenmarkstransplantation bekannt[5]. SZENES und VASVÁRI[6] erzielten mit parenteraler Azulenol-Vorbehandlung eine 31prozentige Herabsetzung der Mortalität ihrer röntgenbestrahlten Mäuse. HOLLÓ und ZLATAROV[7] stellten einen Schutzeffekt von nach der Röntgenbestrahlung gegebenen Selensalzen fest. Neuerdings sind ausgedehnte Untersuchungen mit Serotonin angestellt worden. Besonders LANGENDORFF et al.[8]



Effekt der UV-, Rtg- und kombinierten Bestrahlung auf die Thrombozytenzahl weisser Mäuse.

Tab. I. Die Wirkung vorangegangener UV-Behandlung auf die Sterblichkeit röntgenbestrahlter Mäuse

Rtg-Dosis (r)	Rtg Zahl	tot in 30 Tagen	Rtg + UV Zahl	tot in 30 Tagen	Faktor
500	70	51 = 73%	69	29 = 42%	1,74
550	22	20 = 91%	22	17 = 77%	1,18
600	27	27 = 100%	27	22 = 81,5%	1,23

Tab. II. Durchschnittliche Lebensdauer in Tagen

Rtg-Dosis	Rtg	Rtg + UV
500 r	16	20,2
550 r	8,6	14,5
600 r	6,7	12,8

1 I. CSERHÁTI und K. RÁK, Z. ges. exp. Med. *133*, 138 (1960).
2 I. CSERHÁTI, F. KRIZSA und K. RÁK, Nature *190*, 544 (1961).
3 I. CSERHÁTI, F. KRIZSA und K. RÁK, in Vorbereitung.
4 W. FISCHER und W. D. GERMER, Röntgen-Lab. Praxis *10*, 49 (1957).
5 C. C. CONGDON, *Progress in Hematology* (Ed. Tocantins, Grune-Stratton, New York-London 1959), p. 21.
6 T. SZENES und J. VASVÁRI, Magyar Radiol. *7*, 206 (1955).
7 Z. M. HOLLÓ und Sz. ZLATAROV, Naturwissenschaften *47*, 328 (1960).
8 H. LANGENDORFF, H. J. MELCHING und H. A. LADNER, Strahlentherapie *108*, 251 (1959).

haben sich mit der Strahlenschutzwirkung des Oxytryptamins und Reserpins beschäftigt.

Wir wollen nicht behaupten, dass in der protektiven Wirkung der auf die Hämopoese – oder isoliert auf die Thrombozytopoese – entfaltete Effekt der UV-Bestrahlung der entscheidende Faktor ist, höchstwahrscheinlich handelt es sich um eine Komplexwirkung. Da aber im Zustandekommen des Bestrahlungssyndroms bzw. des Strahlentodes der geschädigten Hämopoese eine wesentliche Rolle zukommt, ist anzunehmen, dass an der günstigeren Gestaltung der Überlebensverhältnisse bei den UV-behandelten Tieren möglicherweise auch die thrombopoetische Wirkung der UV-Strahlung mitbeteiligt ist.

Um einen näheren Einblick in den Wirkungsmechanismus der UV-Strahlung zu gewinnen, soll einerseits die Wirkung der zu verschiedenen Zeitpunkten angewandten kombinierten Behandlung und andrerseits der Effekt des vor der Röntgenbestrahlung gegebenen – den UV-thrombopoetischen Serumfaktor enthaltenden – Serums auf die Mortalität röntgenbestrahlter Mäuse untersucht werden.

Summary. 300 r whole body X-ray irradiation of mice did not decrease the circulating platelet count, if this dose was preceeded by 24 h of ultraviolet-irradiation. More animals survived the X-ray (500, 550, 600 r) injury, if the irradiation occurred after ultraviolet treatment given 24 and 48 h before. The number of days survived is also increased. The ultraviolet light seems to have some protective effect against injury caused by X-ray.

K. Rák, F. Krizsa,
E. Sövényi und I. Cserháti

I. Innere Klinik und Röntgenklinik der Medizinischen Universität Szeged (Ungarn), 12. Juni 1961.

Changes of Ultrafiltrable Hydroxyproline in Blood Serum during Development of Carrageenin Granuloma and during Aging of Rats and Guinea-Pigs

Free hydroxyproline (HYPRO) is a constant component of animal tissues as well as of biological liquids[1–6]. Equally peptides containing HYPRO were proved by us to exist in different tissues[7–9]. In this study we present proofs of their presence and changes in serum of rats and guinea-pigs during aging and the development of carrageenin granuloma in the subcutis of guinea-pigs.

Kivirikko and Liesmaa[10] did not find changes of the content of free HYPRO in serum in two age groups of rats, although the growth hormon increased its level in the serum. Houck and Jacob[11] proved that, parallel with the decrease of collagen content in the necrotic area of the skin after croton oil, an increase of serum HYPRO takes place. It would seem, therefore, that HYPRO has its origin in the degraded collagen of skin. This is the reason why we were interested in how free and peptide-HYPRO change in the course of formation and also in the following resorption of collagen in carrageenin granuloma. That is why the substances mentioned were examined simultaneously with the analysis of the serum also in the granulation tissue.

Method. The serum of the animals was deproteinated by high pressure ultrafiltration with Nojax Cellulose Casings Visking Corp. membrane at a temperature of 1–2°C and pressure of 7 atm. for a total time of approximately 17 h. In deproteinated serum, the content of HYPRO was determined before and after the hydrolysis (6 N-HCl, 140°, 3 h). In this way, the content of free and total ultrafiltrable HYPRO[12] was determined. From the difference, we determined the peptidic HYPRO.

The blood serum for the particular determinations mentioned was pooled from blood of 2–3 guinea-pigs or rats.

The granulation tissue of the subcutis of adult guinea-pigs (350–550 g) was analysed on certain days after the subcutaneous injection of carrageenin for the concentration of deoxyribonucleic acid, free HYPRO, HYPRO bound in peptides and collagen proteins[7,9].

Results. The content of ultrafiltrable HYPRO in the serum of rats and guinea-pigs decreases during aging (Table). There occurs a decrease of free HYPRO, as well as of peptides with HYPRO which we did not find in the serum of adult animals at all or only in traces. The average concentration of ultrafiltrable HYPRO in adult animals is 4 μg/ml serum, in old animals 1–2 μg/ml serum.

The changes of serum ultrafiltrable HYPRO during development of granuloma in adult guinea-pigs are shown in the Figure where, for the sake of comparison with changes in the same biochemical indices, the changes in the granuloma are indicated at the upper part of the graph. It is evident that the pronounced increase of ultrafiltrable HYPRO is caused mainly by the presence of peptides with HYPRO in the serum. The changes in the serum go chronologically parallel with the changes of the substances studied in the granulation tissue, e.g. the maximal changes occur between the 6th and 10th day after the application of carrageenin. The value of the compounds studied in the serum are statistically significantly increased on the 6th to 10th day ($P < 0.01$) compared with the values from the 2nd to 3rd and the 16th to

Changes in serum ultrafiltrable hydroxyproline – free and conjugated – in rats and guinea-pigs of different age

Age	Hydroxyproline μg/ml free	combined	total
Rats			
1 month	10.2	2.4	12.6
2 months	7.5	1.5	9.0
12 months	4.2	0	4.2
18 months	2.0	0	2.0
Guinea-pigs			
200–300 g	4.6	0.8	5.4 ± 0.7
350–500 g[a]	4.0	0	4.0
700–900 g	1.5	0	1.5

[a] Used as controls for carrageenin granuloma – see Figure.

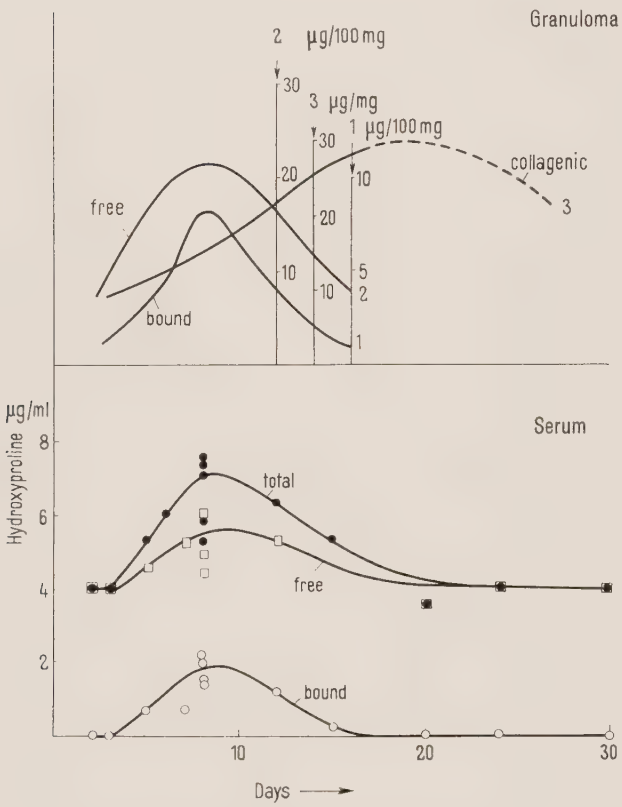
[1] M. Chvapil, Physiol. Bohemoslov. *8*, 186 (1959).
[2] M. Chvapil, Physiol. Bohemoslov. *7*, 391 (1958).
[3] B. B. Westfall, E. V. Peppers, K. K. Sanford, and W. R. Earle, J. Nat. Cancer Inst. *15*, 27 (1954).
[4] G. Biserte, A. Breton, and G. Fontaine, Arch. Franc. Ped. *12*, 988 (1955).
[5] M. Ziff, A. Kibrick, E. Dresner, and H. J. Gribetz, J. clin. Invest. *35*, 579 (1956).
[6] A. Sjoerdsma, J. D. Davidson, S. Udenfriend, and Ch. Mitoma, Lancet *2*, 994 (1958).
[7] M. Chvapil and B. Čmuchalová, Nature *186*, 4727 (1960).
[8] V. Kobrle and M. Chvapil, Nature (in print).
[9] M. Chvapil and B. Čmuchalová, Exp. Med. Surg. (in print).
[10] K. I. Kivirikko and M. Liesmaa, Acta Endocrinol. *27*, 441 (1958).
[11] J. C. Houck and R. A. Jacob, Amer. Surgeon *25*, 344 (1959).
[12] H. Stegemann, Hoppe-Seylers Z. *311*, 41 (1958).

40th day. At the time of the resorption of collagen structure in granuloma, the level of the compounds studied in serum was within the bounds of the norm.

Discussion. The age changes in ultrafiltrable HYPRO in serum are, according to our experience, parallel with the decrease of the level of these substances in different organs (not yet published)[13].

The HYPRO containing peptides which we did not find in the serum of adult animals increased again during the development of carrageenin granuloma. The increase of serum HYPRO compounds could theoretically be expected in three periods of the development of fibroti granuloma: (1) at the time of the infiltration of the sub cutis of the polymorphonuclear leucocytes when an in creased proteolytic activity occurs, (2) at the time c collagen formation or its precursors, (3) at the time of th degradation of collagen at the phase of the resorption c the granuloma. Our results favour the second possibility Although the morphologically provable accumulation c polymorphonuclears precedes the increase of ultrafiltrabl HYPRO in granuloma tissue, and also the serum an peptidic HYPRO correlate rather with the accumulatio of fibroblasts, our results are not a direct proof tha peptides are precursors of collagen. According to Houc and Jacob[14], who found an increase of serum HYPR during inflammation of the skin induced by croton oil, w expected a second peak of ultrafiltrable serum HYPR at the phase of the resorption of collagen. Our negativ finding could perhaps be explained by the differen mechanism of destruction of collagen during croton in flammation, perhaps in the carrageenin granuloma.

As the increase of the serum ultrafiltrable HYPR occurs in the early stage of the fibroplastic inflammation we suppose that the study of these substances could serv for an early diagnosis of fibrotic diseases (precirrhosis presilicosis)[15].



Time correlation of serum and granuloma changes in ultrafiltrable—free and conjugated—and collagen hydroxyproline. The upper part describes schematically tissue changes, for details see [7–9].

Zusammenfassung. Die Konzentration des ultrafiltrier baren Oxyprolins im Serum der Ratten und Meerschwein chen senkt sich während des Alterns. Bei erwachsenen Tieren ist peptidisch gebundenes ultrafiltrierbares Oxy prolin nicht mehr nachweisbar. Während des 6.–10. Tage der Entwicklung des Carrageeningranuloms bei Meer schweinchen steigt die Konzentration des freien und pep tidisch gebundenen Oxyprolins im Serum gleichlaufen mit der Erhöhung dieser Stoffe im Bindegewebe des Gr nuloms.

V. Kobrle and M. Chvap

Department of Experimental Biology, Institute of Industria Hygiene and Occupational Diseases, Prague (Czechoslova kia), June 1, 1961.

[13] The discrepancy of our results and of Kivirikko and Liesmaa[10] could be explained by analysing younger and older rats in our experiments where the decreasing trend is evident (Table).

[14] R. Jacob and J. C. Houck, Surg. Gynec. Obstet. *109*, 85 (1959).

[15] The carrageenin was the gift of Mr. L. Stoloff of Seaweed Chemicals Inc., New Brunswick, to whom we express our thanks.

Induced Increase of Meprobamate Metabolism in Rats Pretreated with Phenobarbital or Phenaglycodol in Relation to Age

In a previous work a remarkable increase of meprobamate metabolism in rats pretreated with phenobarbital or phenaglycodol was reported[1]. The mechanism which produces an increase of meprobamate metabolism is not yet clear but some sort of enzymatic adaptation of the liver of the pretreated animals was supposed[2–4]. In the work reported here, a possible difference in the induction capacity of increased metabolism of meprobamate between different ages of rats was examined.

Rats of Sprague-Dawley strain, weighing 300 g and 180 days old (adult rats), weighing 160 g and 60 days old (young rats), weighing 70 g and 32 days old (immature rats) were used. The determination of meprobamate concentrations in serum and brain was carried out according to the method of Hoffman and Ludwig[5]. Phenobarbital and phenaglycodol were injected intraperitoneally in doses of 80–100 mg/kg, 48 h before the injection of meprobamate (150 mg/kg i.p.).

Figure and Table show that metabolism of meprobamate in phenobarbital or phenaglycodol pretreated rats markedly increased, and, on the other hand, younger rats can metabolize meprobamate more rapidly than older rats. For example: *in vivo* metabolisms of meprobamate by 100 g of body weight for 2 h after the injection were as follows: 3.5 mg for adult rats, 5.3 mg for young rats and

[1] R. Kato, Med. exp. *3*, 95 (1960).

[2] A. H. Conney, C. Davison, R. Gastel, and J. J. Burn, J. Pharm. exp. Therap. *130*, 1 (1960).

[3] R. Kato, Jap. J. med. Sci. Pharmacol., in press.

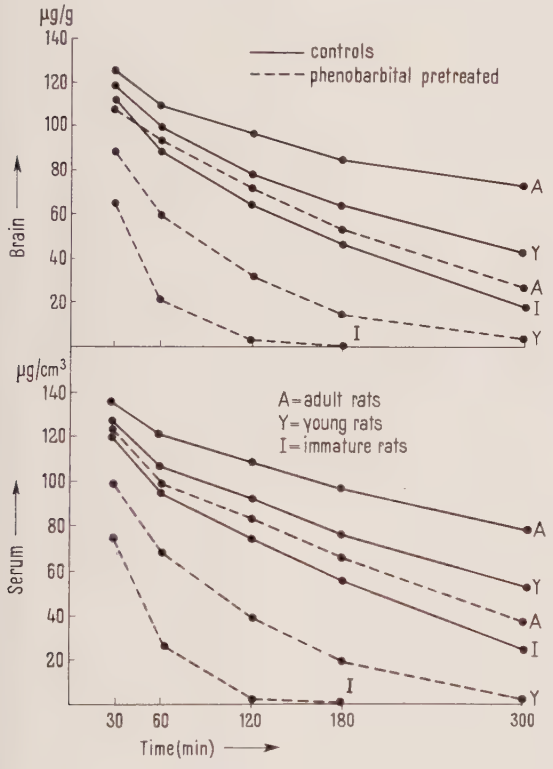
[4] R. Kato, Neuro-psychopharmacology (Ed. Rethlin) *2*, 57 (1936).

[5] A. J. Hoffman and B. J. Ludwig, J. Amer. pharm. Assoc. *68*, 740 (1959).

Effect of phenobarbital or phenaglycodol pretreatment on metabolism of meprobamate in relation to age of rats

Age	Pretreatment	Meprobamate concentration serum (μg/ml)	brain (μg/ml)	*In vivo* metabolism (μg/100 g/2 h)	Variation (%)	Biological half-life (min)	Variation
Adult	—	108 ± 4.1 (12)	97 ± 3.7 (12)	35		345	
Adult	Phenobarbital	84 ± 3.5 (8)	72 ± 3.5 (8)	60	+ 71	150	× 0.44
Adult	Phenaglycodol	96 ± 4.0 (8)	84 ± 3.4 (8)	49	+ 40	—	
Young	—	92 ± 3.4 (15)	79 ± 2.9 (16)	53		195	
Young	Phenobarbital	40 ± 2.1 (8)	31 ± 2.3 (8)	104	+ 96	58	× 0.30
Young	Phenaglycodol	59 ± 3.4 (8)	59 ± 3.5 (7)	75	+ 41	—	
Immature	—	77 ± 2.9 (16)	65 ± 2.7 (16)	67		130	
Immature	Phenobarbital	3 ± 0.9 (8)	4 ± 1.1 (8)	141	+110	31	× 0.24
Immature	Phenaglycodol	28 ± 2.2 (4)	21 ± 1.8 (4)	117	+ 75	—	

Meprobamate concentration was determined 2 h after the injection of meprobamate (150 mg/kg). Metabolism *in vivo* is represented by metabolized meprobamate during 2 h after the injection of meprobamate (150 mg/kg) per 100 g body weight. The numbers in brackets show number of the determination.



Influence of different ages of rats on the induction of increase of meprobamate metabolism. Meprobamate (150 mg/kg) was injected intraperitoneally at 0 time. The abscissas show serum and brain meprobamate concentration.

6.7 mg for immature rats; the biological half-life of meprobamate was 345 min in adult rats, 195 min in young rats and 130 min in immature rats.

It is also demonstrated that the induction of increased meprobamate metabolism is more remarkable in younger rats than in older rats. For example, the meprobamate metabolism in adult rats was increased 71% by the pretreatment with phenobarbital, while in young rats and in immature rats, the metabolism was increased 96% and 110% respectively, and also biological half-life of meprobamate was shortend 56% in adult rats, 70% in young rats and 76% in immature rats by the pretreatment with phenobarbital. It is not yet known why the liver of younger rats is more sensitive than that of older ones in response to the phenobarbital pretreatment. On the other hand, recently it was reported that no difference in the induction of liver tryptophanperoxydase exists in the different ages of the rats used[6].

According to our results, the regenerating liver of the adult rats was still less sensitive than the liver of young rats in the induction, therefore the factors which determine the sensitivity of liver in the induction of the enzyme by phenobarbital are not related to the age of the liver but it might be related to some humoral factors in these animals.

Riassunto. Si è osservato che il metabolismo del meprobamato è tanto più rapido quanto più giovani sono i ratti usati ed anche che l'induzione dell'aumento del metabolismo *in vivo* è tanto più intensa quanto più giovani sono i ratti usati.

R. Kato, E. Chiesara, and G. Frontino

Istituto di Farmacologia e di Terapia, Università degli Studi, Milano (Italy), July 4, 1961.

[6] R. I. Gregerman, Amer. J. Physiol. *197*, 63 (1959).

Effect of Amygdaloid Lesions on Plasma Corticosterone Response of the Albino Rat to Emotional Stress

The rich projection of the amygdaloid nucleus to the hypothalamus (Gloor[1]), suggests that this limbic structure may modulate the hypothalamic-hypophysial response to stress. Experiments undertaken to date have supported this assumption. Mason[2] found in the monkey that partial or complete bilateral amygdalectomy temporarily inhibited the plasma 17-hydroxycorticosteroid response to emotional stress (bar-pressing to avoid electric shock), delaying peak output as much as 6 h. This effect was only obtained, however, at 4 weeks following the operation. This work suggests that the amygdala normally boosts ACTH secretion in the monkey. Martin[3] et al. found high adrenal venous corticosteroid output in dogs

[1] P. Gloor, EEG Clin. Neurophysiol. *7*, 223 (1955); *7*, 243 (1955).
[2] J. W. Mason, Amer. Psychosom. Soc., Montreal, March 26 (1960); Psychosom. Med., in press.
[3] J. Martin, E. Endroczi, and G. Bata, Acta physio. Hung. *14*, 131 (1958).

with previous bilateral removal of the amygdala, suggesting an inhibitory influence of the amygdala on ACTH secretion in this species. In the rat, a recent study by KNIGGE[4] showed that amygdaloid lesions depressed the rate of plasma corticosterone response to immobilization stress, though peak output was eventually comparable to that of normal rats undergoing the same experience.

These experiments suggest that a more precise study of amygdaloid function in stress, using relatively circumscribed lesions within certain amygdaloid sub-nuclei, would provide information unobtainable from studies consisting of extensive or complete amygdalectomy.

The plan of this study was to place bilateral electrolytic lesions in the amygdala of one rat of a pair, and bilateral cortical lesions on the brain convexity in the other (control) animal, then 3 weeks later subject both rats to 15 min of immobilization[5]. Blood samples from each rat were then to be processed together after GUILLEMIN's method[6] to determine fluorometrically the plasma corticosterone level in each one.

A series of 20 male albino rats, Wistar strain, was operated on in pairs at about 90 days of age, the operation on each pair being carried out the same day, usually within an hour or two. The animals were anesthetized by Nembutal, injected intraperitoneally. A bipolar electrode was placed stereotaxically in the brain of each experimental animal at skull coordinates of 3 mm posterior to bregma, 4.5 mm lateral to the midline suture, and to a depth of just beyond 8 mm from the skull surface. The same coordinates were used for the control except that the depth from the skull was 1.5 mm. Holes in the skull were made by a dental drill. Current was applied through a Wyss high-frequency generator for 5 sec at each site, after preliminary trials in egg-white.

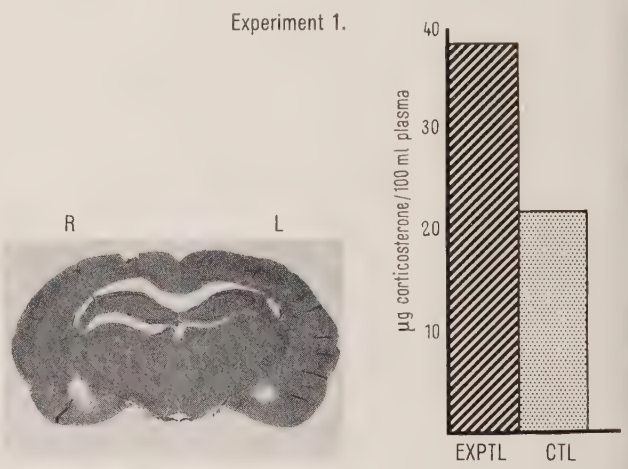
Three weeks following operation of each pair, experimental and control rats were (one at a time) bound up in adhesive tape so that hindlegs and forelegs could not be moved, but not so tightly as to interfere with breathing. Each animal was then placed on its back in a white basin and taped in this position for 15 min. It was then decapitated and blood collected in a 50 ml beaker containing a drop of heparin, care being taken to shake the beaker gently while collecting the blood from the rat's trunk.

The blood sample was then centrifuged and prepared for fluorometry[6]. Plasma from the experimental rat and plasma from the control were then processed at the same time, together with one blank (water) and three standard solutions, containing known amounts of corticosterone. A series of 10 calibration experiments earlier had yielded a recovery rate of corticosterone from plasma of 104.7%, with a standard error for the mean of 3.9%. The average plasma corticosterone level for these unstressed rats was 5.7 μg/100 ml of plasma.

Immediately on decapitation, the brain of each rat was removed and fixed in a solution of 10% formalin for 1 week. The brains were then mounted in paraffin, 10 μ sections were made through each brain at 0.5 mm intervals, and the sections were stained with hematoxylin and eosin.

All lesions mentioned here were identified by histological examination[7]. The cortical lesions in the control rats were found to be located in the superior part of the cortical convexity.

A total of 18 rats was available for immobilization, one amygdaloid lesion animal having died post-operatively. Of the nine remaining pairs, two were eliminated from the experimental results; an error in chemical procedure was made in the case of one pair, and in the case of the other, the experimental rat resorted to abdominal breathing under stress and appeared near death, unlike any other rat, although as far as could be ascertained this was not



Lesions in region of central nucleus of amygdaloid complex, found most effective in inducing increased plasma corticosterone response of rat to brief immobilization, compared to response of paired control rat with cortical lesions (not shown). See Table for details.

[4] K. M. KNIGGE, Fed. Proc. *20*, 185 (1961).

[5] C. FORTIER, in Endocrinology *49*, 782 (1951), has shown immobilization requires participation of the central nervous system to effect a pituitary-adrenal response, and thus can be termed an emotional or neurogenic stress.

[6] R. GUILLEMIN, G. W. CLAYTON, H. S. LIPSCOMB, and J. D. SMITH, J. lab. clin. Med. *53*, 830 (1959); Endocrinology *63*, 349 (1958).

[7] In the case of amygdaloid lesions, this examination was undertaken without prior knowledge of the plasma corticosterone levels resulting in each experiment.

Plasma corticosterone response to immobilization stress of paired rats with amygdaloid lesions (E) and cortical lesions (C). Lesion damage indicated for experimental animals (E) only. Parentheses indicate minimal lesion damage to structures included.

Experiment no.	Lesion damage (E only) to amygdaloid nuclei and adjacent structures		Plasma corticosterone level after stress in μg/100 ml of plasma		
	L side	R side	E	C	E – C
1	central	central (basal, lateral, putamen)	38.50	21.75	16.75
3	(cortical)	(central), optic tract	27.00	20.75	6.25
4	central, basal, (lateral)	central, basal, (medial), optic tract	22.00	29.50	– 7.50
5	central, cortical, (hippocampus)	central, putamen, (hippocampus)	25.25	20.25	5.00
6	(lateral), external capsule, (claustrum)	central, (medial, putamen, cerebral peduncle), optic tract	24.50	17.25	7.25
7	central (basal, putamen, optic tract)	central (medial, optic tract)	33.75	17.00	16.75
9		central, basal (putamen)	28.25	29.25	– 1.00

due to taping. This left a total of 14 rats, or seven pairs, for comparison.

The Table shows that five of six rats with bilateral amygdaloid lesions displayed a greater plasma corticosterone response to the stress of immobilization than their respective paired controls with cortical lesions. There was a reversal in only one case, experiment 4. A unilateral lesion of the amygdala (experiment 9) produced no appreciable difference in plasma corticosterone level. On being taped for immobilization, the amygdaloid lesion rats were in general more emotionally reactive and harder to handle than the controls.

Examination of effects of electrode placement in individual amygdaloid sub-nuclei showed that, when there was substantial bilateral damage to the central nucleus, but no bilateral damage to any other amygdaloid subnucleus, as in experiments 1, 5, and 7, the plasma corticosterone level was distinctly more elevated in the rat with bilateral amygdaloid lesions. The most clear-cut symmetrical lesions of the central nucleus were obtained in experiment 1 (Figure), where the rat with amygdaloid lesions showed an increase in plasma corticosterone following stress that was 16.75 µg/100 ml of plasma greater than the increase for the control.

These three experiments, 1, 5, and 7, showed on the average a difference of 12.83 µg of corticosterone per 100 ml of plasma in favor of the animals with amygdaloid lesions, compared to an average of 1.25 µg in favor of the rats with amygdaloid lesions in the remaining four experiments, 3, 4, 6, and 9. In experiment 4, where as noted above, a reversal occurred, there was substantial bilateral damage to the central nucleus, but there was in addition bilateral damage to the basal nucleus. This was the only instance in this series where this occurred.

These individual comparisons of histologically-determined damage in individual amygdaloid sub-nuclei with the plasma corticosterone response to emotional stress of the rat therefore suggest, in particular for experiments 1, 5, and 7, that bilateral lesions confined to the central nucleus of the amygdala result in an increased plasma corticosterone response to emotional stress in the laboratory rat. In view of the small number of animals and of the topographical scattering of the lesions among various amygdaloid sub-nuclei (Table) statistical methods cannot be justifiably applied to this series[8]. These observations suggest that under normal conditions the central nucleus in the rat amygdala may exert an inhibitory effect upon ACTH release.

Our results, taken together with previous work[2,3] suggest the possible existence of separate inhibitory and facilitatory mechanisms for the pituitary-adrenal response to stress at the amygdaloid level in the rat. Such inhibitory and facilitatory mechanisms have been found at the hypothalamic level in the dog[9] and at the mid-brain level in the rat[10].

Zusammenfassung. Im Vergleich zu Kontrolltieren mit zweiseitigen Rindenläsionen führt beidseitige Zerstörung des Nucleus centralis im Mandelkernkomplex der Ratte zu erhöhter Plasma-Corticosteron-Produktion nach kurzfristigem Stress durch entsprechende Immobilisierung.

E. W. Bovard[11] and P. Gloor

Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, and the Montreal Neurological Institute, Montreal (Canada), June 5, 1961.

[8] An overall comparison of plasma corticosterone response between experimental and control rats was nevertheless made. This showed an average plasma corticosterone level of 28.46 µg per 100 ml of plasma for the seven experimental rats, compared to 22.25 µg for the seven paired controls, a difference of 6.21 µg. This difference was not statistically significant. However, since this sample, for reasons given above, does not lend itself to a meaningful statistical analysis, this negative result does not invalidate the findings. For the purposes of this study, effects of lesion placements in individual sub-nuclei are more relevant, but this work should be repeated on a larger series of animals to allow for the application of statistical methods.

[9] T. Suzuki, E. B. Romanoff, W. P. Koella, and C. K. Levy, Amer. J. Physiol. *198*, 1312 (1960).

[10] M. A. Slusher and V. Critchlow, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *101*, 497 (1959).

[11] This study was made possible by a special research fellowship to one of us, E. W. Bovard, from the United States Public Health Service, sponsored by the National Institute of Mental Health. The writers would like to acknowledge with thanks the interest and friendly cooperation of Dr. H. Jasper, Dr. Hanna Pappius, Dr. Marion K. Birmingham, and the medical and technical staff of Montreal Neurological Institute in this work. This paper was originally presented at a meeting of the Montreal Physiological Society, March 8, 1961.

Present address of Bovard: Department of Anatomy, Albert Einstein College of Medicine, New York (USA).

PRO EXPERIMENTIS

Fine Tipped Metal Microelectrodes with Glass Insulation

It is profitable to use very fine tipped metal microelectrodes, when leading off extracellularly action potentials from single nerve cells in the brain, because the finer the electrode tip, the greater is the recorded potential from a nearby cell in respect to those from units farther away.

With the electropolishing technique, it is possible to make very fine tipped microelectrodes of tungsten[1] or steel[2], which are then insulated with lacquer. It is, however, very difficult to obtain a thin, smooth lacquer layer when the electrodes have a long shaft of less than 20 µ in diameter. Moreover, the mechanical strength of the lacquer layer is unsatisfactory, and when coagulating with high frequency alternating current, the loss over the insulation (or through minute cracks?) is great. A glass insulating layer would be much more satisfactory. Indeed, Johnson and Manhof[3] drew a coat of glass around a platinum wire, but the tips of their electrodes were not thinner than the wire used and blunt. I therefore developed a method for drawing a thin layer of pyrex glass, under microscopical inspection, around an electropolished platinum wire and so obtained tip sizes of controlled, very small dimensions.

A length of platinum wire (10 or 20 µ diameter), a little longer than the desired shaft length, is soldered with silver solder to a short length of thicker copper wire to facilitate the handling (Figure 1a).

Polishing is done in the same way as with tungsten[1]: the utmost tip of the platinum wire is dipped in saturated sodium or potassium nitrite solution, and an alternating

[1] D. H. Hubel, Science *125*, 549 (1957).

[2] J. D. Green, Nature *182*, 962 (1958).

[3] M. W. Johnson and L. J. Manhoff, Science *113*, 812 (1951).

current is passed through the electrolyte between the Pt electrode and a carbon rod. The potential difference has to be 1 to 1.5 V. The immersed tip of the platinum wire is dissolved (the process is slower than with tungsten) until in the end the contact with the nitrite solution is suddenly broken, resulting in a very fine tapered point. The tapering of the point depends on the surface tension of the electrolyte. The point becomes short and pencil-like at high surface tension, but, when surface tension lowering agents are added, it tapers more gradually.

After electropolishing, the electrode is rinsed in water, alcohol, and dried.

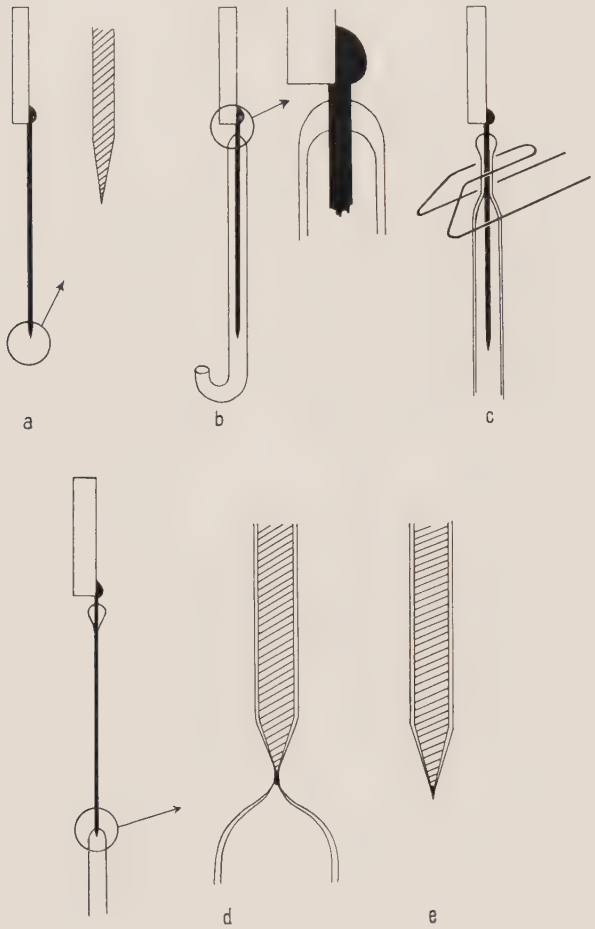


Fig. 1. (a) Platinum wire with electropolished point, soldered to a thicker copperwire, (b) a pyrex capillary with a hook on one end is fixed, (c) by heating the element a thin film of glass is drawn around the platinum, (d) when a tip of suitable size is not yet fused to the glass, the rest of the capillary is broken off, (e) in the vicinity of the tip the glass layer is very thin.

Thin walled pyrex tube of about 3 mm diameter is heated over a gas flame and drawn to capillaries of less than $^1/_2$ mm diameter. Under a dissecting microscope, a short length of the capillary is slid over the platinum wire and fixed to the metal at the upper end by melting with a microburner. At the other end, the capillary is bent to a hook (Figure 1b).

In order to obtain a thin and tight insulating layer, the glass is now heated and drawn out over the electrode in the following way: The electrode is clamped in a holder, which can be moved up and down with a rack and pinion (Figure 2d), and a small weight (Figure 2c) is hooked on. An electric heating filament (Figure 2a) (made of 0.3 mm nichrome wire) is put around the upper end of the electrode and heated, under visual control with a dissecting microscope, to a bright red. The heating current is drawn from a 6.3 V transformer (Figure 2e), which is fed from the mains over a variac (Figure 2f) by which the heating current can be regulated. When the pyrex glass softens, the capillary is drawn out by the weight, the glass forming a thin layer around the electrode (Figure 1c). By raising the electrode with the rack and pinion support, one can draw a thin layer of glass over the whole length of the electrode. In the vicinity of the tip, the heating current is diminished to slow down the process so that one is able to stop heating just when a tip of suitable size is not yet bonded to the glass (Figure 1d). A sharp pull at the hook of the capillary breaks the glass just around the tip, where it forms a very thin layer. The tip region is now briefly heated to ensure a good and smooth bond between the glass and the platinum. The result (Figure 1e) is an electrode with a very fine tip and a smooth and sturdy but thin insulation.

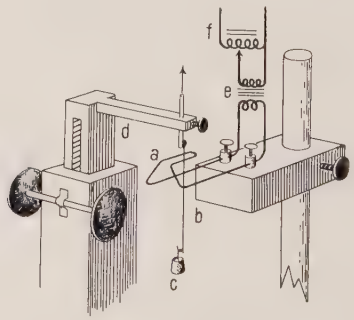


Fig. 2. Set-up for insulating the electrode. (a) heating filament, (b) electrode, (c) weight, (d) rack and pinion support, (e) heating transformer 6.3 V, (f) Variac.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, glasisolierte Platinelektroden mit beliebig feiner Spitze herzustellen.

C. M. BALLINTIJN

Zoological Laboratory of the University of Groningen (Netherlands), April 25, 1961.

Technique d'inclusion et d'ultramicrotomie, destinée à l'étude du développement des organelles dans une cellule isolée[1]

Introduction. L'étude, par coupes ultra-minces, des modifications structurelles qui se déroulent dans les cellules au cours de leur développement, pose certains problèmes de localisation. On peut comparer ces problèmes à ceux que rencontre, en embryologie, l'étude de la genèse d'organes et de systèmes d'organes. Dans l'un et l'autre cas, une démonstration satisfaisante du cours du développement implique deux nécessités: d'une part un contrôle précis du stade évolutif au moment de la fixation, d'autre part la connaissance exacte de l'orientation de l'objet et du plan de coupe. Le nombre élevé d'objets qui

[1] Travail effectué dans le cadre d'une recherche faite en collaboration avec les Instituts d'Histologie et de Biophysique, grâce à une subvention de «Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz».

doivent être examinés et comparés, si l'on veut reconstituer valablement les faits, nécessite une technique rapide et facile. Pour autant l'intégrité parfaite des structures étudiées ne doit pas être compromise.

Ces exigeances n'avaient pas encore, à notre connaissance, trouvé de solution dans le domaine de l'ultramicrotomie. Les descriptions faites étaient basées jusqu'ici pour la plupart sur des coupes orientées au hasard.

Une technique a été mise au point, qui permet de faire des coupes dans un plan défini d'une cellule, isolée à un stade précis de son cycle. Nous l'avons appliquée à l'étude du développement des organelles cytoplasmiques chez *Paramecium bursaria*, cellule de 100 à 130 μ de longueur. Les coupes étaient faites selon un plan équatorial. La comparaison de coupes sériées permet la reconstitution dans l'espace des structures observées.

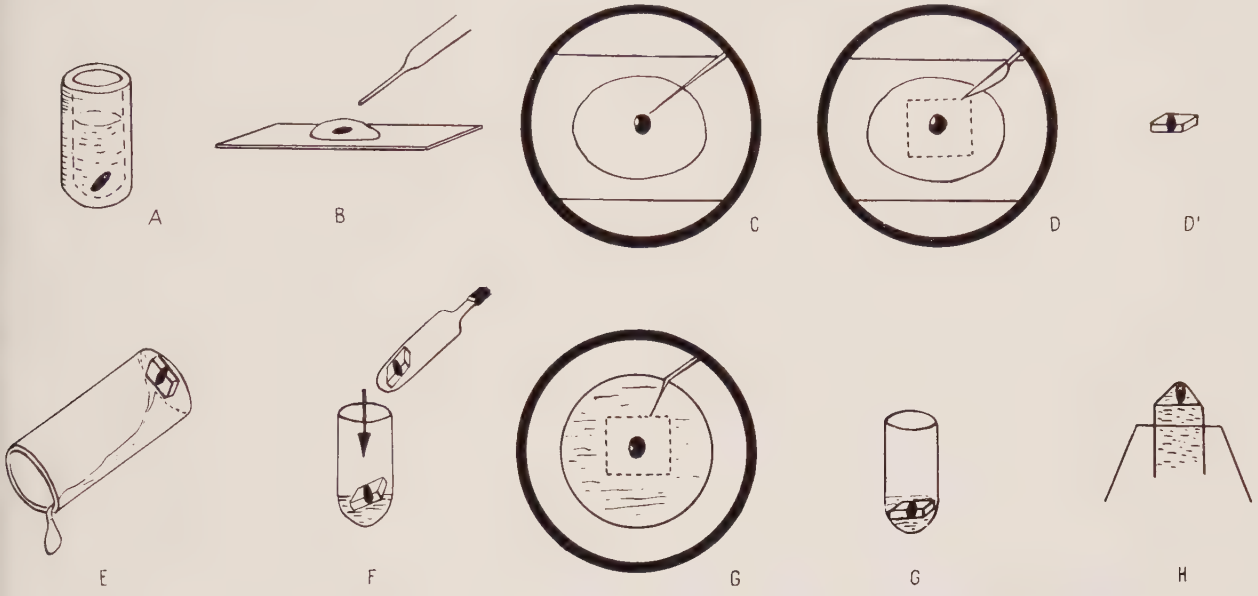


Fig. 1. Méthode d'orientation, lors de l'inclusion d'une cellule isolée (voir texte).

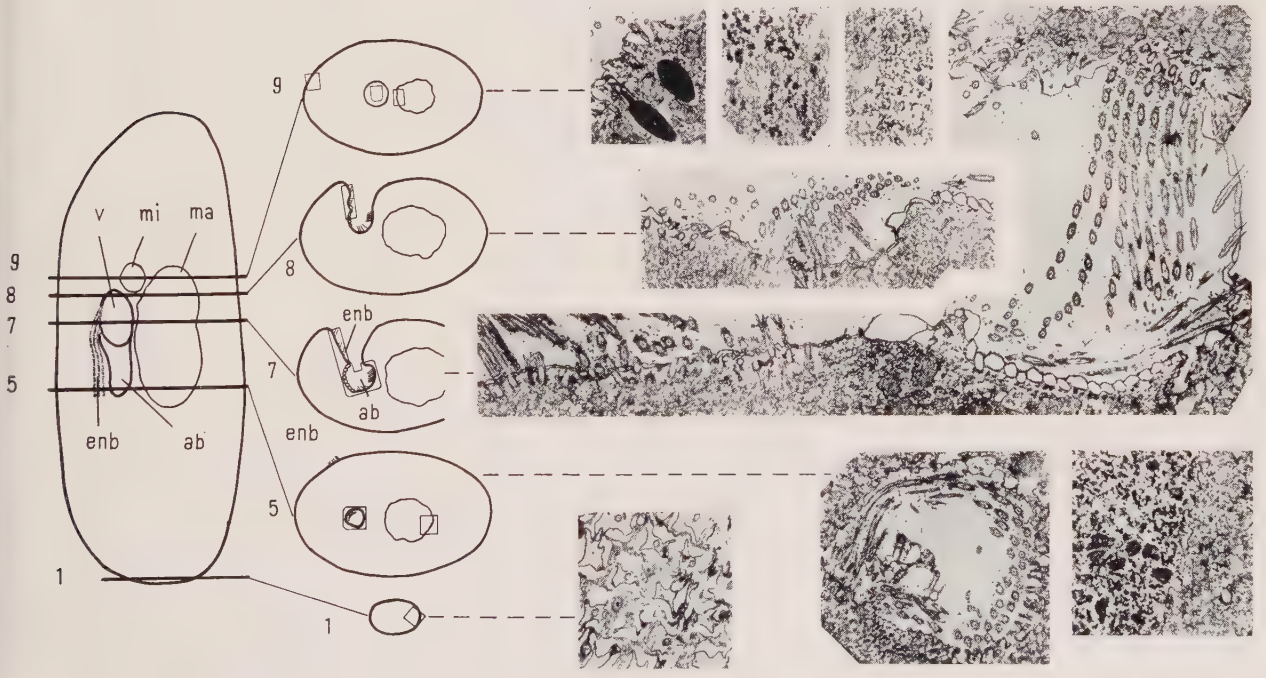


Fig. 2. *Paramecium bursaria*. Reconstitution d'après les coupes orientées. Les traits épais horizontaux et les schémas 1, 5, 7, 8 et 9 représentent les zones coupées. Celles-ci sont en réalité constituées chacune de nombreuses coupes sériées; seule une portion d'une coupe de chaque zone est reproduite ici. Il ressort avec évidence de ces figures que l'ébauche de la nouvelle bouche se forme à l'extérieur de l'ancienne, et que c'est à partir de sa portion antérieure que débute son invagination. ab: ancienne bouche; enb: ébauche de la nouvelle bouche; ma: macronucleus; mi: micro-nucleus; v: vestibule, région pelliculaire entourant l'ancienne bouche. Le contour de chaque micrographie est représenté en traits fins sur le schéma correspondant.

La recherche d'un point précis d'une cellule dans le microscope électronique impose aux coupes une longue exposition au faisceau d'électrons. La sublimation du matériel d'inclusion peut alors entraîner des déplacements dans les structures fines, déplacements qui se traduisent par une forte diminution de la résolution. C'est en fait ce qui se produit avec les objets inclus au méthacrylate. Pour éviter ce phénomène, nous employons le Vestopal W (polyester)[2], recommandé par RYTER et KELLENBERGER[3], dont la stabilité dans le faisceau électronique est parfaite, en ce sens que la sublimation n'entraîne aucune diminution de volume, et maintient par conséquent les structures inclues dans leur position.

Méthode. (a) *Isolement et fixation.* Des cellules sont isolées à un stade précis et placées dans le liquide fixateur dans des tubes de verre à fond rond de 4 mm de ∅ intérieur et de 10 mm de hauteur (Figure 1 A). La méthode et le moment de l'isolement, de même que le choix du fixateur, sont propres à chaque recherche. Dans le cas présent, nous observons une cellule isolée jusqu'à l'instant de sa division. Sachant que le temps de «génération» est de 12 h, on peut ensuite la fixer au moment voulu. L'aspect de la cellule, dans les 40 min qui précèdent la division, permet de déterminer le stade avec encore plus de précision pour cette brève période. Comme fixateur nous avons employé l'OsO_4 à 1% dans un tampon au véronal-acétate de Na (selon Michaelis) au pH 6.

(b) *Pré-inclusion et orientation dans l'agar.* Après la fixation, les cellules sont placées, au moyen d'une pipette de diamètre approprié, dans une goutte d'agar liquide (2% dans le tampon correspondant au fixateur) à 45°C, sur une lame porte-objet tenue prête sur une platine chauffante (Figure 1 B). Avec une fine aiguille de verre, et sous un microscope grossissant 10 à 20 fois, on oriente la cellule dans le plan désiré, en prenant comme futur plan de coupe le plan de la lame porte-objet (Figure 1 C). Puis on laisse refroidir l'agar quelques minutes dans une chambre humide (boîte de Petri). Enfin, l'agar est découpé tout autour de la cellule (prendre un petit scalpel) en un bloc carré de 2 mm de côté et de 1 mm de hauteur (Figure 1 D, D'). Ce bloc permet de manipuler facilement la cellule sans risquer de l'abîmer ou de la perdre.

Lorsque nous travaillons sur des cellules plus petites (Flagellés de 20–30 μ) qui sont difficiles à trouver dans le bloc de Vestopal lors de la taille de la pyramide, nous plaçons dans l'agar un petit morceau de feuille d'aluminium plié en pointe, de telle sorte que la pointe désigne la cellule. Ce fragment d'aluminium a en outre l'avantage de rendre le bloc d'agar bien visible pendant toutes les opérations d'inclusion.

(c) *Inclusion et orientation dans le Vestopal.* Nous avons légèrement modifié le mode d'inclusion au Vestopal W, que nous employons désormais de la façon suivante: Après un bain de 2 h dans l'acétate d'uranyle (0,5% dans le tampon) pour augmenter le contraste, suit une deshydratation progressive dans la série des acétones de 30 à 100%, qui se termine par un deuxième bain d'acétone sec, de 0,5 à 1 ml au maximum. On ajoute alors toutes les demi-heures une goutte de Vestopal W (avec 1% d'initiateur et 1% d'activateur). Il convient de bien mélanger et d'éliminer l'excédent de liquide, pour maintenir le volume initial. Après 10 à 12 adjonctions, le liquide est épais. On vide alors le récipient, en prenant soin que le bloc d'agar reste collé au fond (Figure 1 E). Après adjonction d'un nouveau ml de Vestopal, on laisse le récipient ouvert pendant une nuit à la température ordinaire. Le lendemain, le Vestopal est encore renouvelé pour quelques heures.

On place ensuite les blocs, au moyen d'une fine spatule, au fond d'une capsule de gélatine (inutile de sécher les capsules de gélatine), avec une goutte seulement de Vestopal (Figure 1 F). On oriente alors, sous le microscope, le bloc au fond de la capsule, afin que l'axe de la cellule soit parallèle à celui de la capsule (Figure 1 G, G'). Si la cellule est bien orientée dans l'agar, cela ne présente pas de difficulté. Pour éviter que le bloc ne se déplace après coup dans la capsule, nous laissons polymériser pendant 5 à 6 h à 65°C avant de remplir complètement les capsules de Vestopal et d'achever la polymérisation pendant 36 à 48 h.

(d) *Ultramicrotomie.* Le bloc de Vestopal étant placé bien axialement dans le porte-objet du microtome (Figure 1 H), les coupes passeront exactement dans le plan désiré. On fera des séries de coupes aux niveaux intéressants de la cellule («zones» 1, 5, 7 etc. de la Figure 2), en éliminant par des coupes épaisses les zones inutiles.

Résultat. La Figure 2 montre les résultats obtenus sur *P. bursaria*. Les «zones» indiquées (traits horizontaux épais) sont elles-mêmes composées de coupes sériées. Nous ne montrons ici qu'une portion d'une seule coupe de chaque série.

Bien que les résultats détaillés fassent l'objet de publications à venir, disons d'emblée que la méthode décrite s'est révélée très fructueuse et a permis déjà d'utiles mises au point. Peu avant la division, l'ébauche de la nouvelle bouche (enb) se forme sur la paroi vestibulaire, à l'extérieur de l'ancienne bouche. Elle apparaît sous forme de trois rubans caractéristiques. Ainsi que l'avait déjà montré la microscopie à contraste de phase (EHRET et POWERS[4]), ces rubans sont composés de rangs de cinétosomes. Cette région est donc particulièrement favorable à l'étude de l'apparition de ces organelles et des cils qu'elles supporteront. Pour sa part, le macronucleus subit des changements notables: les nucléoles et la composante chromatinienne varient dans leur structure et leur disposition. Cependant, ces transformations sont uniformes et simultanées dans l'ensemble du noyau, contrairement à ce que l'on observe chez d'autres Ciliés. Enfin, mentionnons que les trichocystes se développent à partir de corpuscules particuliers au sein du cytoplasme, et ne se divisent pas, comme on l'a admis longtemps[5].

Summary. (1) Control of cell orientation and knowledge of the plane of sectioning are indispensable (but generally ignored) requirements for studies of the development of cellular constituents. (2) A simple technique that meets these requirements for the electron microscope is given. (3) As applied to *Paramecium*, it is shown that the ciliary complexes of the new gullet develop outside of the old one, and that invagination begins at the anterior end of the gullet anlage.

G. DE HALLER, CH. F. EHRET[6] et ROSMARIE NAEF

Laboratoire de Protozoologie, Université de Genève (Suisse), le 21 juillet 1961.

[2] MARTIN JAEGER, fournitures pour laboratoires, Vésenaz, Genève (Suisse).

[3] A. RYTER et E. KELLENBERGER, J. Ultrastr. Res. *2*, 200 (1958).

[4] C. F. EHRET and E. L. POWERS, Int. Rev. Cytol. *1959*, 97.

[5] Nous voudrions remercier ici pour leur aimable collaboration Madame E. DEBOURGOGNE et Monsieur E. BOY-DE-LA-TOUR, qui ont effectué les travaux de dessin et de photographie, ainsi que le professeur V. KIORTSIS, qui nous a accordé avec beaucoup de bienveillance, les locaux et toutes les facilités nécessaires à la réalisation de ce travail.

[6] Adresse actuelle: Argonne National Laboratory, Argonne (Illinois).

Une méthode simple d'hypothermie expérimentale

Le principe de la méthode exposée est de faire perdre de la chaleur à l'animal par contact sous-cutané avec un volume d'eau froide s'écoulant à vitesse variée et séparé des tissus environnants par une couche mince de latex.

L'animal anesthesié (nous avons utilisé des chats) est placé sur la table d'opération et un troicart est introduit dans le tissus sous-cutané abdominal. Après avoir retiré le mandrin, on connecte le tube à une pompe de bicyclette ou tout autre appareil de compression. On insuffle ainsi de l'air comprimé dans les tissus, de manière à provoquer le décollement de la peau et la formation d'une poche assez volumineuse (500 ml environ). Le réfrigérateur consiste en un condom ordinaire, aux deux bouts opposés duquel sont fixés deux tubes métalliques de quelques centimètres de longueur. Le réfrigérateur est introduit dans la poche à air par la ponction du troicart et par une seconde ponction, on fait ressortir un des tubes du côté opposé. De cette façon le condom tout entier se trouve dans la poche sous-cutanée.

Il ne reste plus qu'a munir les deux embouts de tubes en caoutchouc, l'un d'eux étant relié au robinet à eau.

Une fois le système réfrigérateur rempli d'eau, la vitesse d'écoulement et le volume du condom sont réglés en manipulant le robinet et une pince de Hoffmann montée sur le tube de sortie.

Pendant la plus grande partie de l'année, l'eau de Sofia a une température de 6 à 8°, amplement suffisante pour amener une baisse de la température rectale de 8 à 9° en l'espace d'une heure environ. On peut, naturellement, obtenir une réfrigération complémentaire de l'eau moyennant un recipient de glace introduit dans le circuit.

La simplicité de la méthode permet son application dans n'importe quel laboratoire. En variant le debit d'eau, la vitesse de la réfrigération peut être reglée à volonté. En outre, à la fin de l'expérience, il suffit pour réchauffer l'animal de faire passer de l'eau à 38° par le même circuit.

Summary. Experimental hypothermia is induced by circulating cold tap water through a latex reservoir introduced subcutaneously in the abdominal region.

I. Mezan

Institut Neuro-psychiatrique, Sofia (Bulgarie), le 7 juillet 1961.

Quantitative Bestimmung der Zellwachstumshemmung

Bekanntlich gelingt es nach der Methode von Puck und Marcus[1], die dann von uns vereinfacht wurde (Edlinger[2]), aus einzelnen Säugetierzellen makroskopische Kolonien zu erhalten. Damit kann – ähnlich wie bei Bakterien – nun auch bei menschlichen Zellen die Hemmung der Koloniebildung durch ein Agens (zum Beispiel Schlangengift, Edlinger und Dietel[3]; Röntgenstrahlen, Dietel-Mauersberger und Edlinger[4]) als Indikator der cytostatischen Wirkung des Agens verwendet werden.

Wir untersuchten, ob mit Hilfe dieser Methode eine quantitative *in-vitro*-Prüfung von chemischen Verbindungen auf ihre zellwachstumshemmende Fähigkeit möglich wäre.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den Zellstamm Detroit 6 (der aus einer Knochenmarkmetastase eines menschlichen Lungencarcinoms von Berman und Stulberg[5] isoliert wurde), aus dem wir durch mehrfache Passagen in Koloniekulturen eine Zellpopulation selektierten, die sich dadurch auszeichnete, dass ständig ein hoher Prozentsatz von isoliert ausgesäten Zellen Kolonien bilden konnte (Koloniebildungsvermögen). Das von uns verwendete Medium bestand aus einem leicht modifizierten Eagle-Medium (Eagle[6]) mit 20% Kälberserum.

Zur Prüfung verwendeten wir fünf Substanzen, die uns in dankenswerter Weise von der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, überlassen worden sind: Actidion (Antibioticum), 9820 (Aethoxydinaphtylmethan), 6005 (Phenanthryl-imidazolin), 7134 (Diphenylimidazolino-methylamin), 3124/51 (Tolyl-imidazolino-methylamin) (Kradolfer und Schär[7]). Es wurden in Nährmedium 1prozentige Stammlösungen hergestellt und durch weitere Verdünnung im Medium die Versuchskonzentrationen erreicht.

Die aus 4–5 Tage alten dichten Zellkulturen durch Trypsinieren und einmaliges Waschen in PBS erhaltene Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Auszählen in der Fuchs-Rosenthalschen Zählkammer auf ihre Zellzahl bestimmt und dann bei stetigem Durchpipettieren in Nährmedium so verdünnt, dass 10 ml Medium einige Hundert Zellen enthielten.

Fig. 1. Demeterflasche mit 400 Detroitzellen beimpft nach 12 Tagen Kultur bei 37°C. Das Medium wurde entfernt und die Zellkolonien mit Methylenblau angefärbt.

[1] T. T. Puck und P. J. Marcus, Proc. Nat. Acad. Sci. USA *41*, 432 (1955).
[2] E. Edlinger, Naturwissenschaften *45*, 425 (1958).
[3] E. Edlinger und B. Dietel, Naturwissenschaften *46*, 516 (1959).
[4] B. Dietel-Mauersberger und E. Edlinger, Naturwissenschaften *48*, 105 (1961).
[5] L. Berman und S. C. Stulberg, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *92*, 730 (1956).
[6] H. Eagle, Science *130*, 432 (1959).
[7] F. Kradolfer und B. Schär, Arch. ges. Virusforsch. *7*, 297 (1957).

Mit Gummistopfen verschlossene Demeterflaschen erhielten je 10 ml Medium. Ein Teil der Kulturen blieb als Kontrolle unbehandelt, die anderen erhielten verschiedene Konzentrationen der zu prüfenden Substanz. Pro Versuch verwendeten wir jeweils 5 Kulturflaschen für die Kontrolle und für jede geprüfte Konzentration. Nach 10–12 Tagen bei 37° wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt (Figur 1).

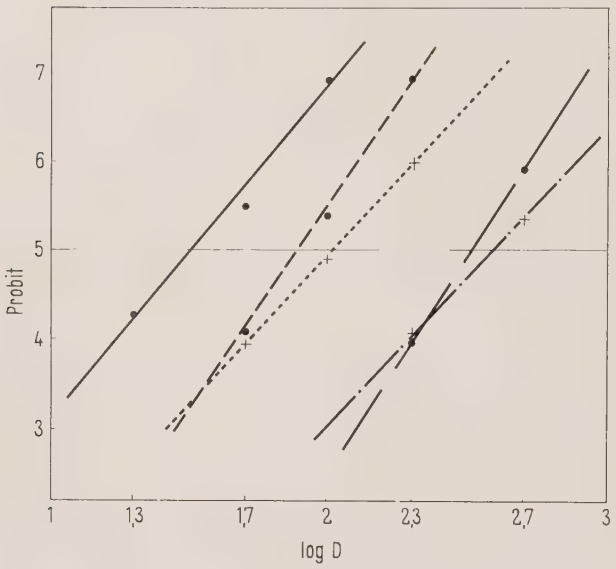


Fig. 2. In Abscisse log der Dosis in μg/ml, in der Ordinate der Prozentsatz des Koloniebildungsvermögens in Probitanordnung. 5 = mittlere cytostatische Wirkung (MCD_{50}); —— = 6005; · · · = 3124/51; – – – = 9820; –·–·– = 7134; ----- = Actidion.

In den Kontrollflaschen konnte der grösste Teil der ausgesäten Zellen Kolonien bilden. Im Vergleich zu den mit Substanz behandelten Kulturen wurde die Koloniezahl der Kontrollen als 100% angegeben und dann der Prozentsatz der entstandenen Kolonien in den Versuchsflaschen bestimmt. Die erhaltenen Resultate wurden nach dem Probitverfahren behandelt und die mittlere wachstumshemmende Dosis (MCD_{50}) bestimmt (Figur 2). Die Substanzen 6005 und 9820 sind besonders wirksam: MCD_{50} 20 bzw. 80 μg/ml.

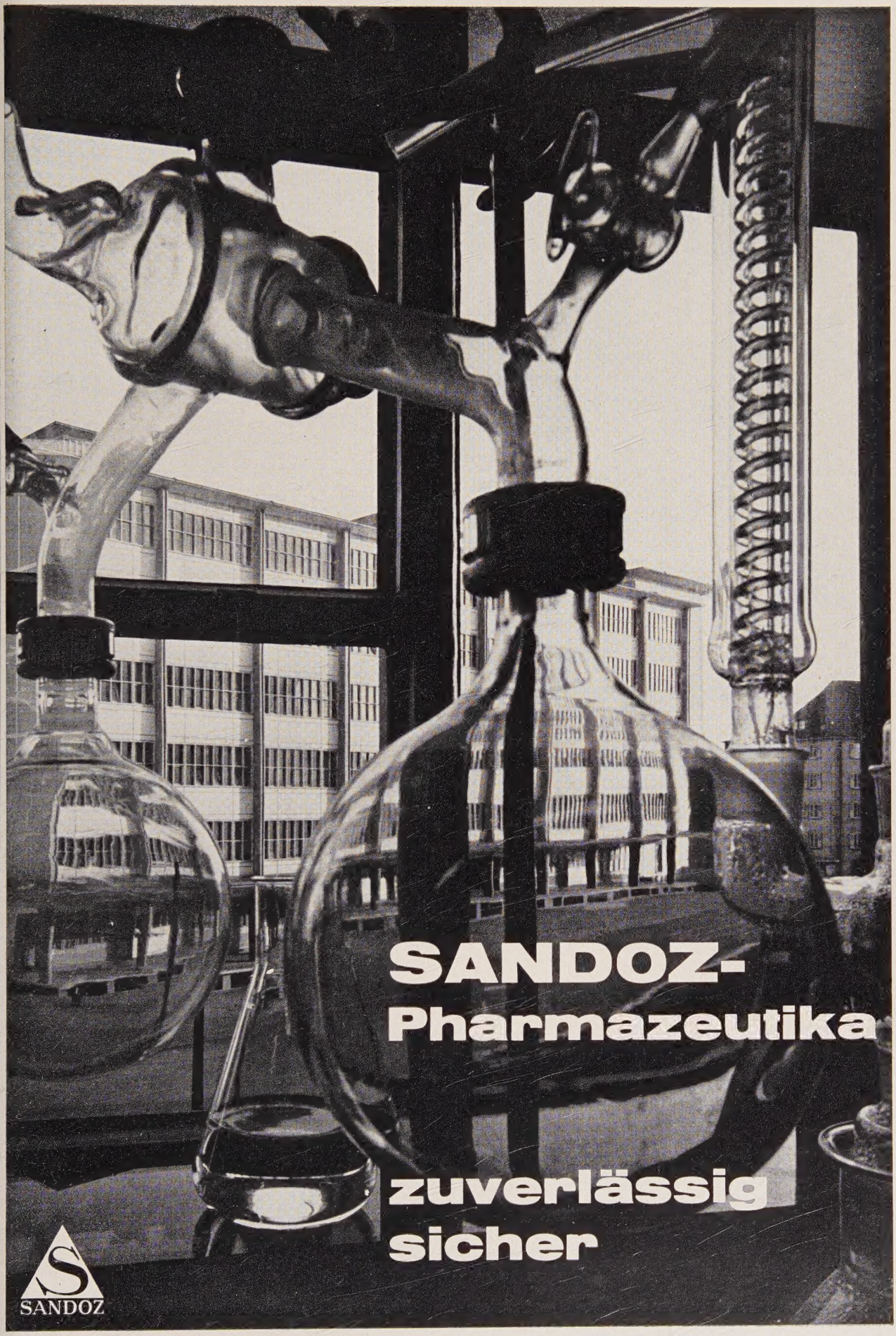
Wir sind der Ansicht, dass sich die beschriebene Methode für ein «*in vitro* screening» cytostatischer Substanzen sehr gut eignen kann. Sie ist relativ einfach und benützt als Masseinheit die Vermehrungsfähigkeit der Zelle selbst. Allerdings kann sie nicht zwischen cytostatischer und cytotoxischer Wirkung unterscheiden, da die Verhinderung der Koloniebildung sowohl durch Wachstumshemmung als auch durch den Zelltod entsteht[8].

Summary. The influence of five cytostatic substances on the colony-forming capacity of cells of the strain Detroit 6 was examined, and the advantages of this method for the *in vitro* screening of cytostatic substances was pointed out.

E. EDLINGER

Institut für Virologie der Humboldt-Universität (Charité), Berlin (Deutschland), 12. Juni, 1961.

[8] Frl. CHR. KORB danken wir für ihre wertvolle technische Mitarbeit.


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Clichés
für Wissenschaft
Technik, Industrie

Steiner + Co. Basel St.Gallen Lausanne

LE ROY

Statistische Methoden der Populationsgenetik

Ein Grundriss für Genetiker, Agronomen und Biomathematiker

Von Prof. Dr. Henri Louis Le Roy, ausserordentlicher Professor für Biometrik und Populationsgenetik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich. 391 Seiten mit 65 Figuren. Preis gebunden Fr. 67.50 (DM 67.50) (1960)

Reihe der experimentellen Biologie, Band 15
Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften»

Aus dem Inhalt: Die Merkmalsprägung – Die Gen- und Umwelteffekte als Korrelationsfaktoren – Die Varianzanalyse als Grundlage für die Schätzung der Gen- und Umweltwirkung – Die künstliche Selektion Literaturverzeichnis (mehrere Hundert Literaturangaben über theoretische und praktische Studien).

Über die rein technische Anleitung hinaus, wie statistische Methoden auf genetische Untersuchungen anzuwenden sind, werden die genetischen Hypothesen aufgezeigt, welche von Fall zu Fall in die verschiedenen statistischen Methoden eingebaut sind. Die klare Formulierung der Hypothese ist die Voraussetzung für die Wahl der richtigen statistischen Analyse. Umgekehrt gilt das Ergebnis einer numerischen Auswertung nur für die Hypothese, von der ausgegangen wurde. Für das Verständnis wird die Kenntnis der grundlegenden statistischen Analysenmethoden vorausgesetzt, wie sie z. B. von Linder (1959 und 1960) in seinen beiden Lehrbüchern sehr instruktiv dargestellt sind. In bezug auf die Genetik genügt die Kenntnis des Mendelismus.

Zu beziehen durch Ihre Buchhadlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

Ch. Wunderly
wissenschaftlicher Mitarbeiter der Medizinischen Universitätsklinik Zürich

Die Papierelektrophorese

Methoden und Ergebnisse

202 Seiten. 72 Abbildungen. Broschiert mit dreifarbigem Schutzumschlag. Fr. 18.80

Zweite, völlig umgearbeitete Auflage

Dr. H. J. Struck schrieb zur 1. Auflage in der *Chemiker-Zeitung:* Aus kompetenter Hand liegt hier eine erste Zusammenfassung der wichtigsten Arbeiten auf dem Gebiet der Papierelektrophorese vor. Mit über 500 Zitaten, vielen Bildern und Kurven bietet es in klarer Form einen ausgezeichneten Überblick über alle Gebiete der Medizin, Biologie und Chemie.

Verlag H. R. Sauerländer & Co.
Aarau

Erhältlich in allen Buchhandlungen

REGIS BIOCHEMICALS

KYNURAMINE DIHYDROBROMIDE
New substrate for a more sensitive, accurate and rapid assay of the enzyme.

MELATONIN
(N-Acetyl-5-methoxytryptamine)
Newly isolated hormone with melanocyte lightening activity.

SEROTONIN HYDROGEN OXALATE
5-Hydroxytryptamine as the Hydrogen Oxalate Salt.

DL 5-HYDROXYTRYPTOPHAN
Metabolic precursor to Serotonin.

5-METHOXYINDOLE
Intermediate to Melatonin and related compounds.

Write for our new catalog.

REGIS CHEMICAL COMPANY
1219 N. Wells Street, Chicago 10, Illinois USA

Im November erscheint
To be published in November
A paraître en novembre

Editor: Dr. Ernst Jucker, Basel

Fortschritte der Arzneimittelforschung

Progress in Drug Research

Progrès des recherches pharmaceutiques

Mit dem 1959 erschienenen ersten Band wurde eine Monographienreihe gegründet, die fortlaufend über aktuelle Gebiete der Arzneimittelforschung orientiert. Der demnächst erscheinende dritte Band enthält sechs Übersichtsreferate bekannter Forscher, die ihre Themen erschöpfend behandeln und darüber hinaus noch Anregungen für die Bearbeitung und Weiterentwicklung verschiedener Forschungsgebiete vermitteln. Auch dieser Band schliesst eine Lücke in der Fachliteratur der Arzneimittelforschung, indem er einen Platz zwischen den bekannten Periodica und den grossen Handbüchern und Monographien einnimmt.

The first volume, which appeared in 1959, initiated a new and up-to-date series of progressive reviews covering topical subjects in pharmaceutical research. The third volume contains six revievs by well-known researchers who not only discuss their subjects in detail, but also make suggestions in which direction further work in various research subjects should develop. This volume also fills a gap in the technical literature dealing with pharmaceutical research; its place is between the known periodicals and the comprehensive text books and monographs.

Vol. 3, ca. 570 Seiten, ca. Fr./DM 90.— (1961)

Inhalt/Contents/Sommaire:

N. P. Buu-Hoï, Paris: Les dérivés organiques du fluor d'intérêt pharmacologique – J. C. Craig and M. R. Tate, Sydney: Structure-Activity Relationships in Certain Anthelmintics – V. Erspamer, Parma: Recent Research in the Field of 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines – W. Kunz, Monheim: Über neue Arzneimittel – G. B. West, London: A Pharmacological Approach to Allergy – Kh. Zepf und Christa Zepf, Ingelheim a. Rhein: Krebswirksame Antibiotica aus Actinomyceten.

Bisher erschienene Bände:

Vol. 1, 608 Seiten, Fr./DM 68.— (1959)

Inhalt/Contents/Sommaire:

J. Büchi, Zürich: Die Ionenaustauscher und ihre Anwendung in der Pharmazie und Medizin – K. K. Chen and T.-M. Lin, Indianapolis: Cholesterol and Its Relation to Atherosclerosis – H.-A. Oelkers, Hamburg: Die Chemotherapie der Wurmkrankheiten – J. Bally, Basel: Neuere Aspekte der chemischen Anthelminticaforschung – H. Haas, H. Fink und G. Härtfelder, Ludwigshafen: Das Placeboproblem – A. H. Beckett, London: Stereochemical Factors in Biological Activity – W. Kunz, Monheim: Eine Übersicht der neueren Arzneimittel aus den letzten fünf Jahren.

Vol. 2, 636 Seiten, Fr./DM 85.— (1960)

Inhalt/Contents/Sommaire:

K. H. Beyer and J. E. Baer, West Point: Newer Diuretics – B. Camerino and G. Sala, Milano: Anabolic Steroids – C. J. Cavallito and A. P. Gray, Decatur: Chemical Nature and Pharmacological Actions of Quaternary Ammonium Salts – A. Cerletti, Basel: Über Vorkommen und Bedeutung der Indolstruktur in der Medizin und Biologie – W. Kunz, Monheim: Über neue Arzneimittel – K. Nádor, Budapest: Ganglienblocker – A. Pletscher, K. F. Gey und P. Zeller, Basel: Monoaminoxydase-Hemmer – W. A. Sexton, Macclesfield: The Structure and Biogenesis of Certain Antibiotics – D. W. Woolley, New York: Antimetabolites and their Revolution in Pharmacology.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung
Obtainable from your bookseller
Commandes à votre libraire

Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart